

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**GSK3 Y MAP QUINASAS COMO DIANA DE LOS
RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS EN NEURONAS
GRANULARES DE CEREBELO: PAPEL EN LA
SUPERVIVENCIA NEURONAL.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Felipe Ortega de la O

Bajo la dirección de las doctoras

Raquel Pérez Sen
M^a Teresa Miras Portugal

Madrid, 2010

- **ISBN: 978-84-693-0708-3**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**GSK3 Y MAP QUINASAS COMO DIANA DE LOS
RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS EN NEURONAS
GRANULARES DE CEREBELO: PAPEL EN LA
SUPERVIVENCIA NEURONAL.**

TESIS DOCTORAL

Felipe Ortega de la O
Madrid 2009

La **Dra. Raquel Pérez Sen**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y La **Dra. M^a Teresa Miras Portugal**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que **Felipe Ortega de la O**, licenciado en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado **“GSK3 y MAP quinasas como diana de los receptores de nucleótidos en neuronas granulares de cerebelo: Papel en la supervivencia neuronal”** como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Abril de 2009

VºBº DIRECTORES

Dra. María Teresa Miras Portugal

Dra. Raquel Pérez Sen

El interesado:

Felipe Ortega de la O

A mis padres y hermana,

A Silvia,

AGRADECIMIENTOS

Sin duda esta tesis ocuparía bastantes más páginas de las que ocupa si expresara en su totalidad mi agradecimiento a todas las personas que de algún modo han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, me gustaría agradecer de corazón a la doctora María Teresa Miras Portugal por darme la oportunidad de descubrir el mundo de la ciencia. Gracias por iniciarme y por guiar mis pasos, por sus inestimables consejos, por transmitirme su pasión por la ciencia y por fiarse más de lo que adivina en la mirada de una persona que en lo que pone en su curriculum.

A la Doctora Raquel Pérez Sen tengo que agradecerle todo, porque esta tesis es tan suya como mía, muchas gracias por ser para mi un ejemplo de trabajo con rigor y con sensatez, por enseñarme siempre con una sonrisa, por su apoyo, confianza y por estos cinco años de trabajo a su lado que para mi han sido un autentico privilegio que nunca olvidaré.

No puedo olvidarme de la Doctora Esmerilda G. Delicado, muchas gracias por sus comentarios y críticas constructivas, por su sabiduría y sobre todo por su genial sentido del humor manchego que siempre me arranca una sonrisa.

También quiero agradecer al resto de profesores y personal del departamento, a Lola por su cariño y por ser la primera todos los lunes, a Javi por sus consejos y simpatía, al casi profe Miguel, a Suso, a Magdalena y a Pepe. Muchas gracias por sus enseñanzas y consejos. Gracias también a MariCarmen, por esas ratas semanales que vienen con sonrisa incorporada, a David, del animalario de la autónoma, por su simpatía y profesionalidad, al Dr Félix Hernández por las medidas de actividad enzimática, a María Luisa y por supuesto a Alba, nuestra “secre numer-one”, por solucionarnos siempre la vida con paciencia y por esas conversaciones que no tienen precio.

Quiero agradecer también a la doctora Magdalena Göetz por permitirme aprender durante tres meses en su grupo de investigación en el GSF, y a los doctores Marcos Costa y Benedikt “Benito” Berninger, por hacer que mi estancia en Munich fuera una gran experiencia que no olvidaré y que espero repetir.

Una de las mejores cosas de estos años ha sido la suerte de trabajar con gente tan genial como mis compañeros de laboratorio:

Cris, con quien empecé mi camino y de quien guardo un buenísimo recuerdo, Luz María que me inició en el mundo del Western y nos conquista cada día con su sinceridad aplastante, Jesús, mi Sensei, muchas gracias por estar ahí, por enseñarme y por acudir en mi ayuda siempre que lo he necesitado, a Patri con quien he pasado buenísimos ratos y que siempre me ha echado una mano, a Nacho podría agradecerle su gran ayuda con el aspecto técnico de la tesis, pero sobre todo quiero agradecerle que sea un genial compañero y amigo, a Miriam, la “oso-gumy” de la ciencia y señora de Faraday, muchas gracias por su amistad, simpatía y cariño, a David León, gran amigo, mejor persona y aun mejor devorador de tortilla de patatas, a María por cuidarnos y darnos esos abrazos cuando más los necesitamos, a Elena “mulderyscully” Fariza, por enseñarme donde esta la línea verde de la vida, a Maibrit nuestra danesa particular, a Rosa a quien respeto enormemente como científica y sobre todo aprecio como persona, a Elvira Salas Hidalgo, porque puede que al final haya sitio en esta hacienda, a las nuevas y simpáticas incorporaciones Paula, Cristina y Elena que lo harán genial y a mi compi Vero que me descoloca y sorprende cada día. No puedo olvidarme de mis otros compañeros, David y Sandra a quien deseo lo mejor en tierras lejanas, a Carolina que ya esta batallando en el mundo laboral, a mi gran amigo del

metal Ricardo que aun me tiene que llevar a Excalibur, a mi amigo Salvatore a quien disfruto saludando cada mañana, a la galáctica Elena que siempre me contagia su optimismo, a Ana, a quien deseo lo mejor por su valentía y simpatía, a Jorge un crack como científico y como persona, me tienes que llevar alguna noche por ahí eh? y sobre todo me llevo un especial recuerdo de Mayka, a quien tengo un gran cariño, muchas gracias por escucharme siempre, por aconsejarme, ayudarme, por todos los buenos ratos y por lo que nos hemos reído, en mi siempre tendrás a un gran amigo.

Muchas gracias a todos ellos por estos años, por su ayuda y amistad, y por hacer que para mi esto nunca haya sido un trabajo, sino un privilegio.

Esta tesis también lleva la huella de mucha gente que no se dedica a la ciencia y que me han ayudado en el camino, mis amigos, que aunque no entendieran bien que estaba haciendo, siempre me han apoyado y escuchado y a quien doy las gracias, a Elisa Lobato, la abuela mas maja de la Facultad de Biología, una de esas personas especiales con quien hablas como si la vieras a diario aunque hayan pasado años, a Carlos “Sambora”, que toca la guitarra como se comporta como amigo, “Impresionable”, a mi gran amigo Pakito, porque el agua nunca pare, a Sergio Priego, quien es y será siempre uno de mis mejores amigos, a Álvaro Wilson por ese “apetito” por la vida y por su amistad que no tiene precio, Paco Wilson, por enseñarme a disfrutar sin horarios, Juanito “a ver abre la boca” Lara, Riky (el siguiente eres tu), y al resto de “el piso”. A mis “otros” amigos Murci y Trivi, por todos los buenos ratos que hemos pasado y pasaremos, a mis primos Kiko y Alberto, a Fina por sus paellas revitalizadoras, a los que estuvieron en la playa y se bañaron, a Marta por esa chapa de moda, a Ron Pearlman por su genial trabajo, a los manowar o managüer, según se mire, y a todos aquellos a los que me puedo estar dejando en el tintero.

Jaime sin duda esta presente en esta tesis por su ayuda con los microarrays, pero sobre todo por la amistad que nos une desde que cometió el error de ponerse la camiseta de Megadeth una mañana de hace muchos años, por poder hablar con él sobre cualquier tema, por los buenos y malos ratos que hemos pasado, por las tardes de warcraft y sobre todo por que me siento muy muy afortunado de ser su amigo.

Esta tesis se la dedico con mucho cariño e ilusión a mi hermana y ONG particular Mamen, por todo lo que me ha ayudado estos años, por su cariño y por ser la mejor hermana que uno puede tener. También se la dedico especialmente a mis padres, por todo su cariño, apoyo, esfuerzo y sacrificio para que pudiera llegar este día, para mi son y serán siempre un ejemplo de cómo se debe ser en la vida y nunca podré agradecerles lo suficiente todo lo que han hecho por mi.

Por último, pero no por ello menos importante, le dedico esta tesis a Silvia, que está presente en cada una de sus páginas por saber comprenderme como nadie. Espero poder devolverte, al menos parte de toda la alegría e ilusión que tu me das gratis cada día. Gracias por compartir mis alegrías y frikismos, por animarme y ayudarme al 100% en los momentos menos buenos y por tu paciencia durante esta escritura, sin duda tengo mucha suerte de haberte encontrado.

Muchas Muchísimas Gracias a Todos Vosotros!!.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y ciencia. Asimismo ha sido financiada con el proyecto BFU2005-02079 de Ministerio de Educación y Ciencia y por la Fundación Marcelino Botín.

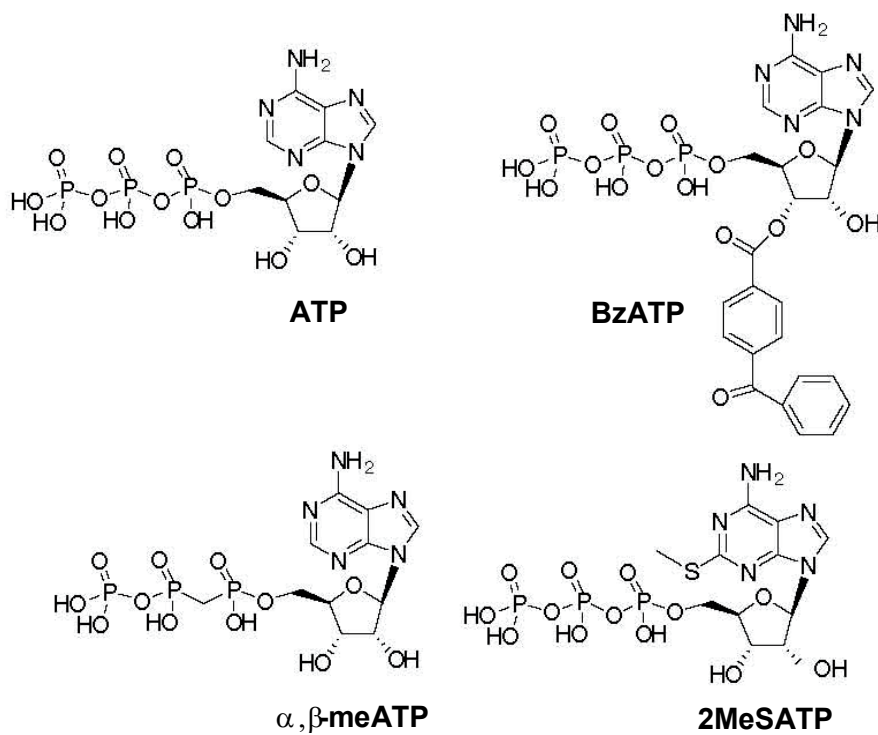
ABREVIATURAS

α , β -meATP	α , β -metilén-adenosina-5'-trifosfato
A-438079	3-[[5-(2,3-Dichlorophenyl)-1H-tetrazol-1-yl]methyl]pyridine hydrochloride
aa	aminoácido
ABC	ATP binding cassette
AC	Adenilato ciclasa
ADA	Adenosina deaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
AMPA	Ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metilisozazol-4-propiónico
AMPC	Adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
Ap₂A	P ¹ ,P ² -Di(adenosina-5')difosfato
Ap₃A	P ¹ ,P ³ -Di(adenosina-5')trifosfato
Ap₄A	P ¹ ,P ⁴ -Di(adenosina-5')tetrafosfato
Ap₅A	P ¹ ,P ⁵ -Di(adenosina-5')pentafofosfato
Ap_nA	Diadenosina polifosfatos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BBG	Brilliant Blue G
BDNF	Factor neural derivado del cerebro
BSA	Albúmina de suero bovino
BzATP	3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adenosina-5'-trifosfato
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio citosólico libre
CaMKII	Calmodulina quinasa II
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
Cy3	Cianina tipo 3
DAG	Diacylglicerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
div	Días <i>in vitro</i>
DTT	Ditiotreitol
EBSS	Del inglés: Earle's Balanced Salt Solution
EC₅₀	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
EDTA	Ácido etilén-diamino tetraacético
EGTA	Ácido etilén-bis(oxonitrilo)-tetraacético
E-NPPasa	Ecto-nucleótido pirofosfatasa
E-NTPDasa	Ecto-nucleotidasa
ERKs	Quinasa Reguladas por señalización extracelular
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GF 109203X	3-(N-[Dimethylamino]propyl-3-indolyl)-4-(3-indolyl)maleimide, Bisindolylmaleimide I,
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
Gö-6976	12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c] carbazole
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazín-N'-(2-etanosulfónico)
IC₅₀	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo

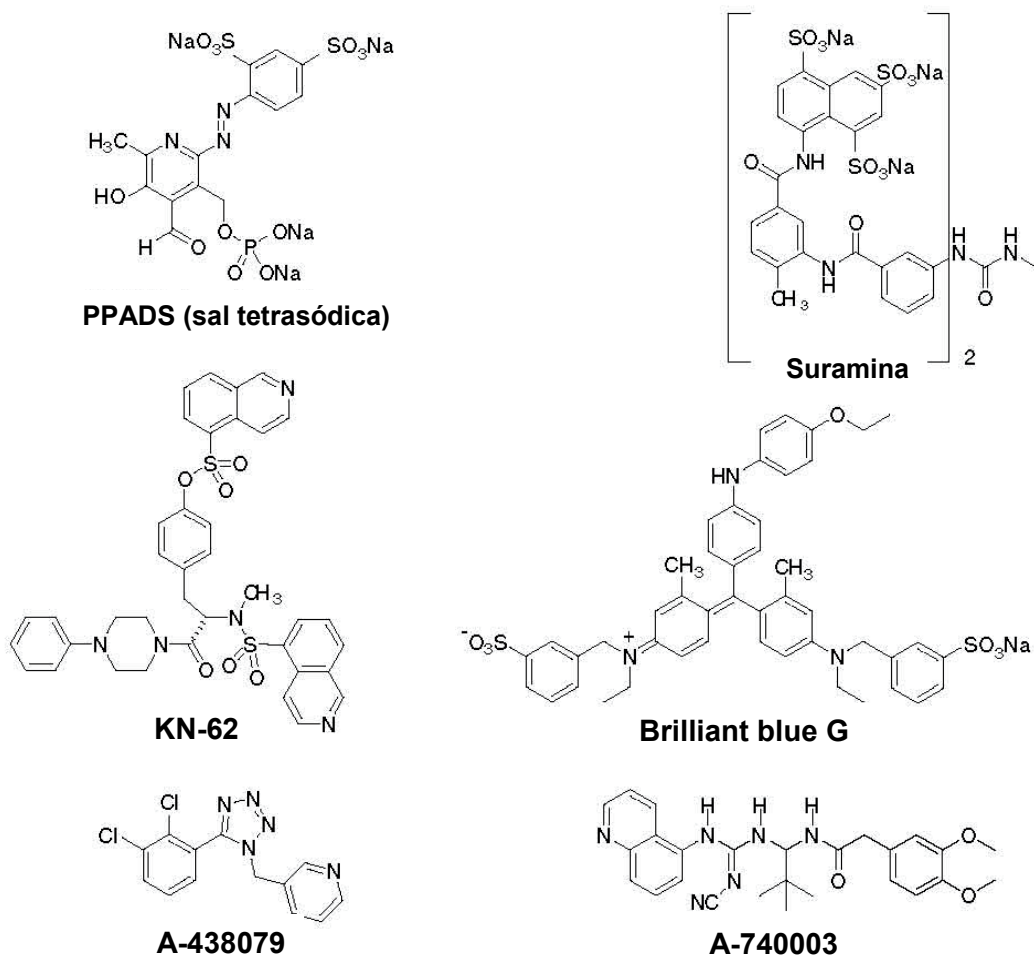
IgE	Inmunoglobulina E
IGF-1	Factor de crecimiento de Insulina tipo 1
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
JNKs	Quinasa de c-Jun
IL	Interleukina
IP₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
Ip₅I	P ¹ ,P ⁵ -Di(inosina-5')pentafofato
KN-62	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazine.
KO	Knockout
LY-294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MRS-2179	2'-Deoxy-N6-metiladenosina 3',5'-bisfosfato
MRS-2211	6-(2'-chloro-5'-nitro-azophenyl)-pyridoxal-alpha5-phosphate
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difemil tetrazolio
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NeuN	Neuronal Nuclei
NF-κB	Factor nuclear-κB
NGF	Factor de crecimiento neural
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
NMP	Nucleótido monofosfato
NO	Óxido nítrico
oATP	Adenosina-5'- trifosfato oxidado
PACAP	Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFA	<i>p</i> -formaldheído
Pi	Fosfato inorgánico
PI₃K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteína quinasa A (dependiente de AMPc)
PKB/AKT	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C (dependiente de Ca ²⁺ /fosfolípidos)
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fenilmetilsulfonyl fluoruro
PP2	4-amino-5-(4-chlorofenil)-7-(t-butil)pirazolo[3,4-d]pyrimidine
PPADS	Ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico
PTX	<i>Toxina pertussis</i>
PVDF	Polifluoruro de vinilo
Pyk2	Tirosina quinasa rica en prolina 2
RT	Transcripción inversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNC	Sistema Nervioso Central
TM	Transmembrana
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate monolithium trisodium salt
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
U-0126	1,4-Diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)butadieno
U.A.	Unidades arbitrarias de absorbancia o fluorescencia
UDP	Uridina 5'-difosfato
UTP	Uridina-5'-O-(3-tiotrifosfato)
2MeSADP	2-Metil-tio- adenosina-5'-difosfato
2MeSAMP	2-Metil-tio- adenosina-5'-monofosfato
2MeSATP	2-Metil-tio- adenosina-5'-trifosfato

ESTRUCTURAS QUÍMICAS

A)

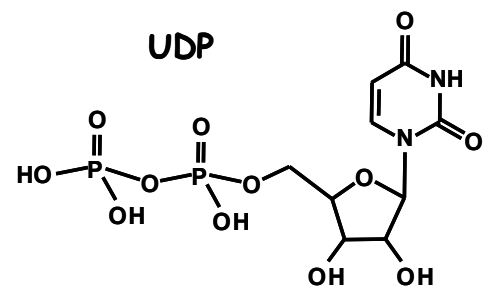
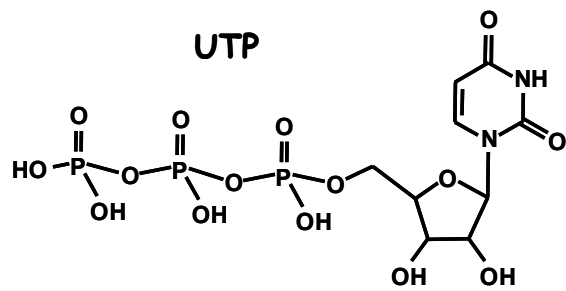
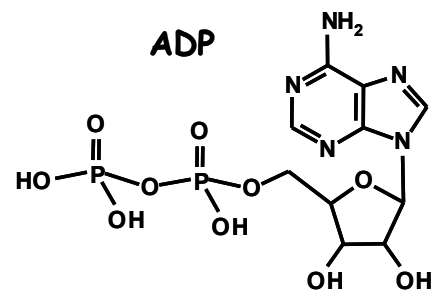
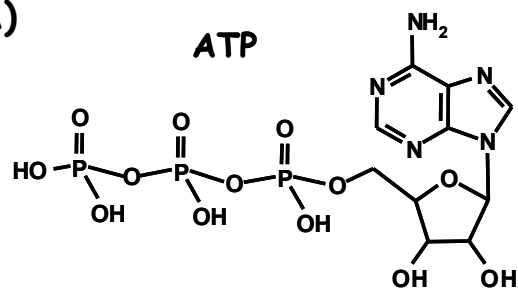


B)

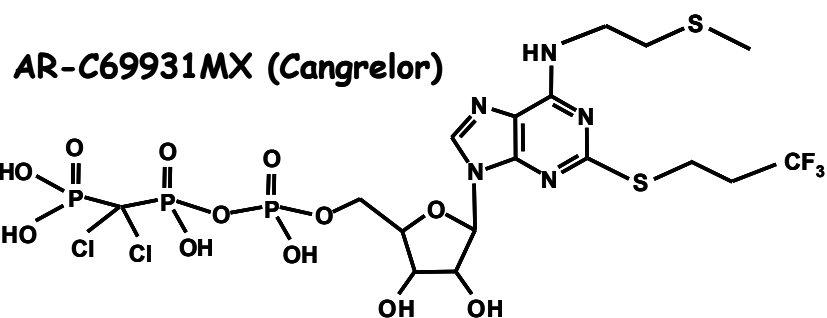
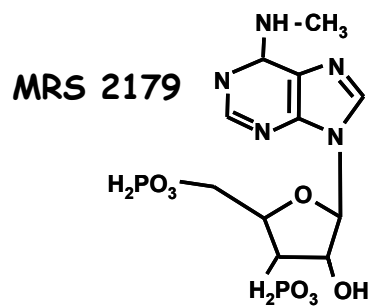


Principales agonistas y antagonistas de los receptores de nucleótidos P2X

A)



B)



Principales agonistas y antagonistas de los receptores de nucleótidos P2Y

SUMMARY.....	1
 INTRODUCCIÓN.....	 17
1.- EL SISTEMA PURINÉRGICO.....	19
<u>1.1.- Los nucleótidos en el sistema nervioso. Papel en la neurotransmisión.....</u>	19
<u>1.2.- Almacenamiento, liberación y degradación de los nucleótidos.....</u>	20
<u>1.3.- Receptores de nucleótidos.....</u>	23
<u>1.4.- Receptores ionotrópicos P2X.....</u>	27
1.4.1.- Estructura de las subunidades P2X.....	28
1.4.2.- Oligomerización de las subunidades P2X.....	29
1.4.3.- Características funcionales de los receptores P2X.....	32
1.4.4.- Modulación de los receptores P2X.....	33
1.4.5.- Farmacología de los receptores P2X.....	35
1.4.6.- Distribución tisular y funciones fisiológicas de los receptores P2X.....	43
<u>1.5.- Receptores P2Y.....</u>	47
1.5.1.- Estructura de los P2Y.....	49
1.5.2.- Vías de señalización activadas por P2Y.....	51
1.5.3.- Farmacología de los receptores P2Y.....	53
1.5.4.- Distribución y Funciones de los P2Y.....	57
1.5.5.- Receptores P2Y y funciones terapéuticas.....	63
2.- EL CEREBELO.....	64
<u>2.1.- Anatomía del cerebelo.....</u>	64
<u>2.2.- Histología y citoarquitectura del cerebelo.....</u>	65
<u>2.3.- Circuito neuronal cerebeloso, vías aferentes y eferentes.....</u>	67
<u>2.4.- Avances en el conocimiento de las funciones del cerebelo.....</u>	68
<u>2.5.- La neurona granular en el cerebelo.....</u>	69
<u>2.6.- La neurona granular como modelo de estudio de la apoptosis.....</u>	70
3.- GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK3).....	72
<u>3.1.- Introducción general.....</u>	72

<u>3.2.- Mecanismos de regulación de la GSK3</u>	74
3.2.1.- Regulación por fosforilación.	74
3.2.2.- Regulación de la GSK3 por formación de complejos proteicos.	77
3.2.3.- Regulación de la GSK3 por fármacos para el tratamiento del trastorno bipolar o por inhibidores específicos.	81
<u>3.3.- Sustratos regulados por la GSK3</u>	81
<u>3.4.- GSK3 y apoptosis</u>	83
3.4.1.- Potenciación de la vía intrínseca mitocondrial de apoptosis por la GSK3.	84
3.4.2.- Inhibición de la vía extrínseca de apoptosis por la GSK3.	86
<u>3.5.- GSK3 y enfermedades asociadas. Posible dianas terapéuticas</u>	87

OBJETIVOS.	93
-------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS.	97
----------------------------	----

1.- MATERIALES	99
<u>1.1.- Material biológico</u>	99
<u>1.2.- Instrumentación</u>	99
1.2.1.- Instrumentación general.	99
1.2.2.- Cultivos celulares	100
1.2.3.- RT-PCR	100
1.2.4.- Microfluorimetría e inmunocitoquímica.	100
1.2.5.- Western Blot	101
<u>1.3.- Reactivos y productos químicos</u>	101
2.MÉTODOS	104
<u>2.1.- Obtención y cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata</u>	104
<u>2.2.- Técnicas de microfluorimetría: Determinación de la concentración intracelular de Ca²⁺ en neuronas granulares individuales</u>	106
<u>2.3.- Análisis de RNAm en neuronas granulares de cerebelo de rata</u>	110
2.3.1.- Extracción de RNA	110
2.3.2.- Cuantificación de RNA	111
2.3.3.- RT-PCR simple	111

2.4.- Inmunotransferencia	112
2.4.1.- Extracción de proteínas a partir de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.	112
2.4.2.- Cuantificación de proteínas.	113
2.4.3.- Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas.	114
2.5.- Inmunocitoquímica	116
2.6.- Tratamiento de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo	117
2.7.- Medida de la actividad GSK3 in vitro	117
2.8.- Determinación de la viabilidad celular	118
2.8.1.- Ensayo de viabilidad celular mediante el kit: LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit	118
2.8.2.- Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT	119
2.8.3.- Kit de detección <i>in situ</i> de muerte celular (TUNEL) de Roche.	120
2.9.- Análisis de microarray	121
2.10.- Análisis estadístico de los datos	121
RESULTADOS	123
1.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS ACOPLADA A LA PROTEÍNA GSK3 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO	125
1.1.- Señalización de los receptores nucleotídicos P2Y de tipo metabotrópico acoplada a la GSK3 en neuronas granulares de cerebelo. Señalización mediada por el receptor P2Y13	125
1.1.1.- Fosforilación de la proteína GSK3 mediada por agonistas nucleotídicos de tipo metabotrópico en neuronas granulares. Efecto del 2MeSADP	126
1.1.2.- Identificación del receptor implicado en la respuesta inducida por el 2MeSADP sobre la fosforilación de la proteína GSK3 en neuronas granulares	128
1.1.3.- Vías de señalización activadas por el 2MeSADP en neuronas granulares	132
1.1.4.- Efecto del 2MeSADP sobre la actividad GSK3 en neuronas granulares	134
1.2.- Señalización de los receptores nucleotídicos P2X de tipo ionotrópico acoplada a la GSK3 en neuronas granulares de cerebelo	138
1.2.1.- Fosforilación de la proteína GSK3 mediada por agonistas nucleotídicos de receptores tipo P2X en neuronas granulares. Efecto del BzATP	138
1.2.2.- Identificación del receptor P2X7 como responsable de la respuesta inducida por el BzATP sobre la fosforilación de la proteína GSK3 en neuronas granulares	141
1.2.3.- Mecanismo de señalización del BzATP en neuronas granulares	143
1.2.4.- Efecto protector del BzATP frente a la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K en neuronas granulares	145
1.2.5.- Vías de señalización implicadas en el efecto protector del BzATP. Papel de la GSK3	150

2.- ESTUDIOS DE SINERGISMO ENTRE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR EL BZATP Y LA MEDIADA POR EL NMDA Y BDNF EN NEURONAS GRANULARES.	156
<u>2.1.- Efecto sinérgico del BzATP con el NMDA y BDNF en la protección frente a la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K en neuronas granulares.</u>	156
<u>2.2.- Vías de señalización implicadas en la neuroprotección mediada por el NMDA y el BDNF.</u>	158
<u>2.3.- Sinergismo del BzATP y el NMDA en la fosforilación de la GSK3.</u>	161
<u>2.4.- Sinergismo entre el BzATP y el NMDA en la señal de calcio en las neuronas granulares de cerebelo.</u>	164
3.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS ACOPLADA A LAS PROTEÍNAS ERK-1/2 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.	166
<u>3.1.- Señalización de los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP acoplada a proteínas ERK-1/2 en neuronas granulares de cerebelo.</u>	
<u>Señalización mediada por los receptor P2Y₁₃ y P2X7.</u>	166
3.1.1.- Fosforilación de las proteínas ERK-1/2 mediada por el 2MesADP en neuronas granulares.	166
3.1.2.- Mecanismo de señalización del 2MeSADP sobre las proteínas ERK-1/2 en neuronas granulares. Dependencia de la vía PI3K/Akt.	170
3.1.3.- Fosforilación de las proteínas ERK-1/2 mediada por el BzATP en neuronas granulares.	170
3.1.4.- Mecanismo de señalización del BzATP sobre las proteínas ERK-1/2 en neuronas granulares. Dependencia de la activación de la CaMKII.	174
<u>3.2.- Efecto protector del 2MeSADP y del BzATP frente a la excitotoxicidad mediada por glutamato en neuronas granulares de cerebelo.</u>	174
4.- ESTUDIO DEL EFECTO A NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR NUCLEÓTIDOS EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA.	178
<u>4.1.- Modulación de la expresión génica en neuronas granulares de cerebelo activada por el agonista nucleotídico BzATP.</u>	179
<u>4.2.- Modulación de la expresión génica en neuronas granulares de cerebelo activada por el agonista nucleotidico 2MeSADP.</u>	183

DISCUSIÓN.....	187
1.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS ACOPLADA A LA FOSFORILACIÓN E INHIBICIÓN DE LA GSK3 EN LAS NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA.....	189
<u>1.1.- Señalización mediada por el receptor P2Y₁₃.</u>	189
<u>1.2.- Señalización mediada por el receptor P2X₇.</u>	193
<u>1.3.- Sinergismo entre el BzATP con el NMDA y BDNF.</u>	197
2.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS ACOPLADA A LAS PROTEÍNAS ERK/1,2 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.....	201
3. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE LA SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS P2Y ₁₃ Y P2X ₇ EN LAS NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.....	205
 CONCLUSIONES.....	 207
 BIBLIOGRAFÍA.	 213

SUMMARY

INTRODUCTION.

Cerebellar granule neurons provide a good model to study the molecular mechanisms involved in survival and differentiation, as the agents and signalling cascades are well characterized in these cells (Contestabile 2002). They can be maintained in culture in the presence of depolarizing potassium concentrations (25 mM), and under these conditions, they develop the morphological, electrophysiological and biochemical characteristics of mature neurons (Burgoyne et al. 1993). The removal of high potassium, which is mimicking neuronal activity, commits granule neurons to apoptotic cell death, and the signalling events in the apoptotic cascade are well characterized.

Several survival agents are able to rescue granule neurons from low potassium-induced apoptosis, these being growth factors such as IGF-I and BDNF, and other trophic agents, like NMDA and cyclic AMP (D'Mello et al. 1993) (D'Mello et al. 1997) (Zhang et al. 1998). All these factors are usually coupled to the PI3K (phosphatidyl-inositol-3-kinase)/Akt axis, this pathway being an important survival signalling route in neurons (Pap and Cooper 1998) (Zhang et al. 1998), (Hetman et al. 1999). Interestingly, in the granule cell model, all these survival promoting factors have in common the inhibition of GSK3 (glycogen synthase kinase-3) activity, the mandatory downstream event in the PI3K/Akt signaling, GSK3 being a convergent point in the survival cascade (Miller et al. 1997; Lafon-Cazal et al. 2002) (Yamagishi et al. 2003; Chin et al. 2005). In addition, most of these neurotrophic factors are also coupled to the activation of the extracellular signal regulated kinases (ERK1/2), which belong to the mitogen activated protein kinase (MAPK) family, and these proteins are also associated to important functions related to survival, cell differentiation and proliferation or neuronal plasticity (Hetman and Gozdz 2004) (Hetman and Xia 2000) (Pearson et al. 2001) (Adams and Sweatt 2002).

In the present Thesis, we raised the question whether, besides trophic factors, other extracellular signals could be coupled to GSK-3 and ERK-1/2 signalling, and function as potential survival signals displaying protective actions in cerebellar granule neurons against different pro-apoptotic stimuli.

Among these signals, nucleotides are good candidates, as they act as important signalling molecules in both peripheral and central nervous system (CNS). Nucleotides exhibit neuroprotective actions because of the modulation of neurotransmitter release, and display survival responses after brain injury or in neurodegenerative disorders (Burnstock 2005) (Burnstock 2006) (Neary and Kang 2005). They cooperate with growth factors to trigger proliferation and differentiation in glial cells (Neary et al. 1999) and mediate specific actions, such as inflammatory responses (Di Virgilio 2005) (Kucher and Neary 2005), pain signalling and transmission regulation (Gerevich and Illes 2004) (Inoue et al. 2005) and the neural and

endothelial control of vascular tone (Erlinge 1998).

The versatility of actions mediated by nucleotides is explained by the diversity of nucleotide receptors being expressed at the nervous system that are classified in two receptor families. The ionotropic P2X receptors are ligand-operated channels formed by the assembly of several subunits (P2X1-7), and are coupled to the entry of extracellular calcium (North 2002). The metabotropic nucleotidic receptors, P2Y, are G protein-coupled receptors mainly associated to PLC activation and intracellular calcium mobilization. They can be identified on the basis of the agonistic preferences, as P2Y₁ receptors are responsive to adenine nucleotides, especially ADP, and P2Y₂/P2Y₄ can respond to both adenines and pyrimidines, being the P2Y₆ subtype specific only for pyrimidines. The P2Y₁₁ subtype is the only one coupled to adenylyl cyclase activation and the preferential agonist is ATP. A subfamily of P2Y receptors is formed by the most recently cloned, P2Y₁₂, P2Y₁₃ and P2Y₁₄, which respond to ADP and UDP-glucose, respectively, and have in common their coupling to adenylyl cyclase inhibition. These two families are well represented in cerebellar granule neurons, as they express a great variety of both ionotropic (P2X1, P2X2, P2X4, P2X7) and metabotropic receptors (P2Y₁, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₂) which exhibited specific functions and locations (Hervas et al. 2003) (Hervas et al. 2005) (Sanchez-Nogueiro et al. 2005). Previous studies of the group revealed that P2Y₁ and P2X7 receptors were coupled to phosphorylation and activation of CaMKII and synapsin I (Leon et al. 2006) (Leon et al. 2008). We continue these studies in the present work and found that nucleotide receptors can be acting as important survival promoting factors in granule neurons on the basis of their coupling to GSK3 and ERK-1/2, signalling.

RESULTS AND DISCUSSION

Nucleotide receptor signaling coupled to the phosphorylation and inhibition of the GSK3 in cerebellar granule neurons.

Signalling pathways mediated by metabotropic P2Y receptors.

We evaluated the level of GSK3 phosphorylation by western blot experiments, using specific antibodies against the phosphorylated forms of GSK3 at Ser21/9 residues (for α and β isoforms, respectively). We tested several metabotropic nucleotidic agonists and 2MeSADP

turned out to be the most potent one inducing GSK3 phosphorylation, as was it able to increase basal levels of GSK3 phosphorylation around two-fold. This effect was transient and reached a maximum after 10 min of stimulation. This nucleotidic agonist could be activating several types of ADP receptors in granule neurons, such as P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, some of them previously shown to be expressed in this cellular model (Hervas et al. 2003) (Leon et al. 2006).

Several attempts were done in order to identify the receptor involved in 2MeSADP-induced GSK3 phosphorylation. Experiments performed in the presence of *Pertussis toxin* completely abolished the 2MeSADP-mediated effect, confirming the requirement of a Gi-coupled receptor, of the P2Y₁₂ and P2Y₁₃ types, and excluding the participation of P2Y₁ receptors in the effect of 2MeSADP in GSK3 phosphorylation. In accordance to this, studies with specific antagonists for ADP receptors revealed that only the specific P2Y₁₃ antagonist MRS-2211 was able to abolish the effect mediated by 2MeSADP, suggesting the involvement of a P2Y₁₃ receptor in GSK3 phosphorylation. On the contrary, MRS-2179 and 2MeSAMP, specific antagonists for P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors, respectively, were without effect (Hollopeter et al. 2001) (Kim et al. 2005) (King 2003). When dose–response experiments were performed with 2MeSADP and the endogenous agonist ADP, similar EC₅₀ values were found for both compounds. These results prove that 2MeSADP-induced GSK3 phosphorylation is mediated by a P2Y₁₃ receptor, for which similar potency of ADP and 2MeSADP has been described (Communi et al. 2001) (Sellers et al. 2001) (Fumagalli et al. 2004). In addition, the expression of the P2Y₁₃ receptors was confirmed in granule neurons by RT-PCR, western blot and immunocytochemistry. Taken together all these data confirm for the first time the presence of P2Y₁₃ receptor in a neuronal model and indicate that these are the ADP nucleotide receptors responsible for GSK3 phosphorylation mediated by 2MeSADP in cerebellar granule neurons.

It is interesting to notice that the expression levels of P2Y₁ receptors in these cells were similar to that obtained for P2Y₁₃ receptors, in comparison to P2Y₁₂, whose expression was very weak and fairly unspecific. This agrees with the co-expression of several types of ADP receptors observed in several cell models, such as dendritic cells, cerebellar astrocytes and platelets (Marteau et al. 2004) (Carrasquero et al. 2005) (Carrasquero L. M. G. 2006). In addition, it is generally observed that this coexpression results in cross-talk between the receptors, as that described for the platelet model, in which P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors interact reciprocally (Hardy et al. 2004). In this respect, an interaction between P2Y₁₃ and other P2Y receptors mediating the effect of 2MeSADP in cerebellar granule neurons cannot be excluded.

When we investigated the intracellular mechanism of action of 2MeSADP, the PI3K/Akt pathway resulted to be a key intermediate step in 2MeSADP signalling. In fact, 2MeSADP-induced GSK3 phosphorylation was only abolished in the presence of the PI3K inhibitor wortmaninn, while other intracellular signalling cascades, such as ERK-1/2 and src-tyrosine kinases, did not seem to participate. According to this, there are many examples in the literature

Summary

involving this route in the signalling displayed by ADP receptors, such as P2Y₁ in astrocytoma cells and P2Y₁₂ receptors in C6 glioma, in which they are mediating proliferative actions (Sellers et al. 2001) (Gerasimovskaya et al. 2005) (Van Kolen et al. 2006). Our studies provide the first evidence for the coupling of a P2Y₁₃ receptor to this PI3K/Akt signaling in a neuronal model, in the same way than trophic factors.

It is well documented that GSK3 phosphorylation at Ser residues can imply the inhibition of its catalytic activity towards its substrates (Grimes and Jope 2001). This effect was confirmed by testing the activity of the GSK3 in cerebellar granule neurons towards two specific substrates, one endogenous and one synthetic. We observed a significant decrease in the GSK3 kinase activity on a synthetic peptide derived from the glycogen synthase enzyme when the cells were stimulated with 2MeSADP. In addition, the loss of GSK3 activity was also evaluated with an endogenous substrate, which is β -catenin. When phosphorylated by GSK3, β -catenin is ubiquitinated and becomes degraded by the proteasome pathway. Under conditions of GSK3 inactivation, β -catenin is stabilized and accumulates in the cytosol and can be translocated to the nucleus where it functions as a transcriptional regulator. We observed by immunocytochemical studies a significant increase in the cytosolic immunostaining levels of the β -catenin in cells stimulated by 2MeSADP. Nuclear translocation of β -catenin was also analyzed by western blot carried out with nuclear extracts. The nuclear level of the β -catenin was significantly higher when the cells were stimulated by 2MeSADP, and this effect was dependent of the PI3K/Akt pathway. The effect of 2MeSADP was reached after only 10 min after stimulation, remaining for 1 – 6h, and was faster than the one mediated by the trophic factor IGF-I, which required more prolonged incubation times.

The coupling of 2MeSADP signalling to β -catenin described in the present work has not been previously reported for nucleotides. The nuclear translocation of β -catenin allows its interaction with Lef/Tcf family of transcription factors (Dominguez and Green 2001) (Grimes and Jope 2001). Different genes have been reported to be regulated by β -catenin, such as those involved in cell cycle regulation, cell adhesion, migration and survival (Novak and Dedhar 1999) (Harris and Peifer 2005). Besides, two genes related to purinergic metabolism were recently described to contain Lef-1 binding sites in their promoter region, the 5'-nucleotidase (CD 73), a nucleotide hydrolytic ectoenzyme, and adenosine deaminase, which deaminates adenosine into inosine (Spychala and Kitajewski, 2004). In relation to the genes that 2MeSADP could be regulating in granule neurons, a first approach has been done in this work that implies microarray experiments. This is only a starting point and need further analysis and processing, in order to understand the physiological meaning of β -catenin signalling mediated by 2MeSADP in granule neurons.

Signaling pathways mediated by ionotropic P2X receptors.

After studying the effect mediated by metabotropic receptors on GSK3 phosphorylation, we decided to analyze whether the ionotropic P2X receptors were also coupled to this signaling pathway in this cellular model. As we previously did with the metabotropic receptors, we tested several agonists of the P2X receptors expressed in cerebellar granule neurons (Hervas et al. 2003) (Hervas et al. 2005), and found the major responses with the P2X7 agonist BzATP. BzATP is usually employed to analyze P2X7 activation, although it is described to activate other P2X nucleotide receptors (Bianchi et al. 1999). To discriminate better P2X7-mediated responses, stimulations with BzATP were carried out in the absence of Mg^{2+} , as P2X7 responses can be specifically potentiated when extracellular magnesium is reduced or eliminated, this being one of the hallmarks of P2X7 receptor functioning (Virginio et al. 1997) (North 2002).

BzATP at 100 μM concentration was able to increase the phosphorylation of GSK3 3 – 4-fold over basal levels. The effect peaked at 5 – 10 min stimulation, but, in comparison to that obtained for 2MeSADP, it was maintained for longer stimulation periods of 30 min and 60 min, with a slow decline. This effect fits perfectly with the pharmacological profile described for a rat P2X7 receptor, since it was calcium-dependent, the EC_{50} values were in the low micromolar range (Young et al. 2007) and it was completely blocked by the specific P2X7 receptor antagonists, BBG, PPADS and A-438079 (Jiang et al. 2000) (Hibell et al. 2001) (Donnelly-Roberts and Jarvis 2007).

The signalling pathway involved in the BzATP-mediated effect was a PKC dependent mechanism, since specific inhibitors of this enzyme, GF-109203X (GF-I) and Gö-6976, abolished the increase in GSK3 phosphorylation levels. However, the treatment with the ERK-activating kinase-1 (MEK-1) inhibitor, U-0126, caused increments on GSK3 phosphorylation basal levels by itself, and BzATP was not able to induce a further increase. Therefore, a cross-talk between MAPKs and GSK3 cannot be excluded. In our opinion, the most interesting result in these experiments was that the BzATP-mediated effect was independent on the PI3K/Akt pathway, which was the main survival signalling pathway described in granule neurons. This gave us the key to analyze the possible neuroprotective effect of the BzATP against the apoptosis induced in these cells by the pharmacological inhibition of the PI3K (Miller et al. 1997) (D'Mello et al. 1997).

The BzATP protective effect was studied measuring cell viability with the MTT assay, and measuring the number of apoptotic cells with the TUNEL assay. The treatment with BzATP before the addition of the PI3K inhibitor, LY-294002, partially prevented cell death and increased the cellular survival in approximately 30 %. This neuroprotective effect was lost in the presence of P2X7 specific antagonists, BBG, PPADS, and A-438079. In addition, it was

Summary

completely abolished by the PKC inhibitor, GF-I. These results mimicked that obtained for GSK3 phosphorylation and confirmed on the one hand, the involvement of a P2X7 receptor in the neuroprotective effect induced by BzATP in cerebellar granule neurons, and on the other hand, as expected, that this effect was mediated through a PKC-dependent pathway.

Finally the next set of experiments were carried out to investigate if the BzATP survival effect was dependent on its effect on GSK3 phosphorylation. The treatment with the PI3K inhibitor, LY-294002, significantly reduced the levels of GSK3 phosphorylation in Ser residues after few hours of treatment. In parallel with this there was a progressive increase in GSK3 catalytic activity, which was evaluated measuring the phosphorylation levels of one of the best known GSK3 substrates in neurons, the Tau protein, with the PHF-1 antibody (Bennecib et al. 2000). When cells were pre-treated with BzATP, GSK3 phosphorylation levels were partially recovered, and Tau phosphorylation was diminished, therefore indicating that BzATP treatment is helping to restore phosphorylated GSK3 levels and to avoid excessive activation of GSK3 catalytic activity that is coupled to cell death. The association between the survival promotion mediated by BzATP and the prevention of apoptotic effectors such as caspase-3 was also examined. Treatment with LY-294002 increased the active caspase-3 fragment levels that were readily detectable at 3 h, and markedly increased after 6 and 8 h. This effect was also prevented when the cells were pre-treated with BzATP.

The above results clearly demonstrate that the survival promoting effect found for BzATP in granule neurons is directly related to its action on GSK-3 inhibition. In fact, GSK-3 is outlined as one of the main effectors of apoptosis in neuronal models (Pap and Cooper 1998); (Hetman et al. 2000). In a recent report it was demonstrated that a component of the intrinsic apoptotic cascade, the protein Bax, was identified as a direct target of GSK-3 action (Linseman et al. 2004). This implies that signals that can maintain a decreased GSK-3 activity can function as important pro-survival signals. In the case of BzATP, it keeps GSK-3 inhibited in conditions in which the main survival route to GSK-3, the PI3-K/Akt axis is compromised or inhibited. A similar role to that found for BzATP, was described for NMDA in cortical neurons, as was able to rescue cortical neurons from the apoptosis induced by LY-294002 treatment. This protective effect is also dependent on NMDA-mediated inhibition of GSK-3 activity (Habas et al. 2006).

Synergistic effects of BzATP in the signalling and survival effect of NMDA and BDNF and NMDA in cerebellar granule neurons.

The neuroprotective effect observed for BzATP raised the question whether this nucleotide could act in concert with other well known survival factors in granule neurons, such as NMDA and BDNF, and cooperate with them (Lafon-Cazal et al. 2002) (Yamagishi et al. 2003) (Zhang et al. 1998) (Hetman et al. 1999).

When the effects of BzATP were combined with NMDA and BDNF, it was observed that BzATP was able to potentiate the protective effect of both NMDA and BDNF against cell death induced by treatment with the PI3K inhibitor, LY-294002. The synergistic effect between BzATP and NMDA was only observed at submaximal concentrations of both factors. However, in the case of BDNF, the cooperation was manifested at every concentration. In parallel to that previously obtained with BzATP, PKC seemed to play a crucial role in both the NMDA and BDNF-mediated protective effects. Interestingly, besides PKC, the ERK-1/2 proteins were found to be an additional requirement for BDNF to exert its protective effect.

Accordingly to that previously observed for BzATP, both NMDA and BDNF were also able to prevent the dephosphorylation effects over GSK3 induced by the treatment with LY294002. Interestingly, BDNF was the only factor that was able to induce a significant increase in the phosphorylation levels of the ERK1/2. The levels of the active fragment of the caspase-3 were also tested, and as a result of the combined treatment of BzATP with NMDA and BDNF, the levels were highly reduced after 6 hours of treatment with LY-294002, in comparison with to that seen with each of the factors alone.

From the above results is clear that, in a similar way to that found for BzATP, NMDA and BDNF exert their protective effect through the phosphorylation and inhibition of GSK3. When the signalling mechanisms were analyzed in more detailed, it was confirmed that NMDA-induced GSK3 phosphorylation was strongly dependent on PKC in the same way as BzATP. This explains why the synergistic effect seen with BzATP and NMDA is only observable at submaximal concentrations, as they are acting through the same signalling pathway.

With respect to BDNF, its effect on GSK3 phosphorylation was dependent on several signalling pathways, PI3K, PKC and ERK-1/2. This indicates that BDNF can switch to the PKC-ERK-1/2-GSK3 intracellular cascade when the PI3K-Akt-GSK3 pathway is inhibited, as occurs during LY-294002 treatment. The versatility of BDNF triggering different intracellular mechanisms have been already described in cortical neurons (Hetman et al. 1999) (Gozdz et al. 2003), and explains the cooperative effect with BzATP over a wide range of, as they are reaching GSK3 through different signalling routes.

Nucleotide receptor signaling coupled to the phosphorylation and activation of the ERK1/2 in cerebellar granule neurons.

After investigating the signaling mediated by nucleotide receptor coupled to the GSK3 protein, we analyzed the possible coupling of these receptors to another signaling protein, the ERK1/2, as these kinases are also related to neuronal differentiation and survival and are involved in several important processes in the CNS (Hetman and Gozdz 2004) (Hetman and Xia 2000) (Pearson et al. 2001) (Adams and Sweatt 2002).

We focused our studies on the effect of 2MeSADP and BzATP. Both nucleotidic agonists were able to induce significant increases in the ERK1/2 phosphorylation levels in granule neurons. In both cases, these increments reached the maximum levels around 10 min after stimulation and then rapidly declined to basal levels. The transient activation of ERK-1/2 well correlates with the described neuroprotective-mediated effects for these proteins (Subramaniam et al. 2003) (Subramaniam et al. 2005) (Shinozaki et al. 2006). In a similar way to that observed for GSK3 signalling, the effect of 2MeSADP on ERK-1/2, phosphorylation was mediated by a P2Y₁₃ receptor, since it was calcium independent and was blocked by the specific P2Y₁₃ antagonist MRS-2211. Other antagonists for P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors, such as MRS-2179 and 2MeSAMP, respectively, were without effect. Besides this, the EC₅₀ values obtained for 2MeSADP fitted perfectly to what is described for this receptor in rat (Communi et al.) The signalling pathway involved in the effect of 2MeSADP on ERK-1/2, phosphorylation was also PI3K-dependent. These results indicate that PI3K is a key intermediary step in P2Y₁₃ receptor signalling in granule neurons, and from this common starting point, two independent and parallel signalling pathways, GSK3 and ERK1/2, are segregated.

In agreement to that previously described for GSK3 signalling studies, BzATP-induced ERK1/2 phosphorylation was mediated through the activation of a P2X7 receptor, since the effect was extracellular calcium-dependent, the EC₅₀ values fitted to that described for this receptor in rat (Young et al. 2007) and the effect was abolished by P2X7 specific antagonists, BBG, A-438079 and PPADS (Jiang et al. 2000) (Hibell et al. 2001) (Donnelly-Roberts and Jarvis 2007). However, the signalling pathway mediating this effect was completely different from the one involved in GSK3 phosphorylation, and was dependent on calcium calmoduline kinase II (CaMKII), since only the specific inhibitor, KN-62, was able to abolish the ERK-1/2 phosphorylation induced by BzATP.

Finally, the physiological effects of nucleotide receptor signalling coupled to the activation of ERK1/2 proteins were investigated in granule neurons. We analyze the neuroprotective effect of both nucleotides, 2MeSADP and BzATP, against glutamate-mediated excitotoxicity, since the ERK1/2 has been described to be involved in the survival pathway against this type of toxic damage in several neuronal types (Singer et al. 1999) (Ferchmin et al. 2003) (Wu et

al. 2004). As was expected, both 2MeSADP and BzATP were able to protect granule neurons against toxic levels of glutamate, increasing the survival closely to the basal levels. This effect was completely dependent on the activation of the ERK1/2 proteins when the cells were treated with 2MeSADP, and partially dependent in the case of the BzATP, suggesting the involvement of another signalling pathway, such as the GSK3-dependent pathway.

From the above results it can be concluded that the physiological meaning of nucleotide receptor signalling through GSK3 and ERK-1/2 in cerebellar granule neurons is linked to neuronal survival. It is also relevant that nucleotides function as versatile signals that can use different intracellular mechanisms to trigger the appropriate responses against several kinds of apoptotic stimuli, and therefore, they could be considered as important neuroprotective factors acting alone or in combination with other trophic factors in this neuronal model.

Taking into account that both GSK3 and ERK-1/2 are involved in the control of the activity of several transcription factors, as the β -catenin itself, a first approach to deepen into the survival promoting mechanism of nucleotides derives from microarrays experiments, which were developed to investigate whether nucleotide receptor activation could be inducing changes at the genetic expression level in cerebellar granule neurons. The first preliminary data derived from these experiments showed increases in the biological processes and molecular functions related to survival, differentiation and growth factor receptor activity, in agreement with the results presented in this Thesis. However, further studies are required to fully confirm these results.

CONCLUDING REMARKS

- 1.- The nucleotide agonist 2MeSADP acting through a Gi-coupled P2Y receptor is linked to the phosphorylation and inhibition of GSK3 through a PI3K/Akt dependent pathway in granule neurons. This signalling involves the translocation of the GSK3 substrate β -catenin to the nucleus where can act as a transcriptional regulator.
- 2.- The nucleotide agonist BzATP activates a P2X7 receptor in granule neurons and is coupled to the phosphorylation and inhibition of GSK3 through a different signalling pathway that involves a PKC-dependent mechanism. This BzATP-mediated signalling and its independence on the PI3K/Akt axis allow BzATP to exert protective effects against the apoptosis induced by the pharmacological inhibition of the PI3K. This supports a neuroprotective role for BzATP in conditions of trophic factor deprivation.
- 3.- BzATP cooperates with other relevant survival factors of granule neurons, such as NMDA and BDNF, in the neuroprotective action against PI3K inhibition. In the case of NMDA, the synergistic effect depends on its convergence on the same signalling route PKC/GSK3. While

with respect to BDNF, this convergence does not take place, and the cooperative neuroprotective effect depends on BDNF triggering an alternative PKC/ERK/GSK3 route.

4.- P2Y₁₃ and P2X7 nucleotide receptors are also coupled to ERK-1/2 phosphorylation and activation in granule neurons, and this signalling mechanism is responsible for their survival promoting effect against glutamate-induced excitotoxicity.

BIBLIOGRAPHY

- Adams, J. P. and J. D. Sweatt (2002). "Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 135-63.
- Benneceb, M., C. X. Gong, et al. (2000). "Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain." *FEBS Lett* **485**(1): 87-93.
- Bianchi, B. R., K. J. Lynch, et al. (1999). "Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes." *Eur J Pharmacol* **376**(1-2): 127-38.
- Burgoyne, R. D., M. E. Graham, et al. (1993). "Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells." *J Neurocytol* **22**(9): 689-95.
- Burnstock, G. (2005). "Purinergic signalling: therapeutic potential." *An. R. Acad. Nac. Farm* **71**: 283-319.
- Burnstock, G. (2006). "Historical review: ATP as a neurotransmitter." *Trends Pharmacol Sci* **27**(3): 166-76.
- Carrasquero L. M. G., D. E. G., Miras-Portugal M.T. (2006). "Which is the receptor mediating ADP signaling in rat cerebellar astrocytes." *Purinergic Signalling* **2**(Abstract (th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, Ferrara, Italy).
- Carrasquero, L. M., E. G. Delicado, et al. (2005). "Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors." *Purinergic Signal* **1**(2): 153-9.
- Communi, D., N. S. Gonzalez, et al. (2001). "Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i)." *J Biol Chem* **276**(44): 41479-85.
- Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." *Cerebellum* **1**(1): 41-55.
- Chin, P. C., N. Majdzadeh, et al. (2005). "Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors." *Brain Res Mol Brain Res* **137**(1-2): 193-201.
- D'Mello, S. R., K. Borodezt, et al. (1997). "Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling." *J Neurosci* **17**(5): 1548-60.
- D'Mello, S. R., C. Galli, et al. (1993). "Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 10989-93.
- Di Virgilio, F. (2005). "Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells." *Purinergic Signal* **1**(3): 205-9.
- Dominguez, I. and J. B. Green (2001). "Missing links in GSK3 regulation." *Dev Biol* **235**(2): 303-13.

- Donnelly-Roberts, D. L. and M. F. Jarvis (2007). "Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states." Br J Pharmacol **151**(5): 571-9.
- Erlinge, D. (1998). "Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells." Gen Pharmacol **31**(1): 1-8.
- Ferchmin, P. A., D. Perez, et al. (2003). "Nicotinic receptors differentially regulate N-methyl-D-aspartate damage in acute hippocampal slices." J Pharmacol Exp Ther **305**(3): 1071-8.
- Fumagalli, M., L. Trincavelli, et al. (2004). "Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor." Biochem Pharmacol **68**(1): 113-24.
- Gerasimovskaya, E. V., D. A. Tucker, et al. (2005). "Extracellular ATP-induced proliferation of adventitial fibroblasts requires phosphoinositide 3-kinase, Akt, mammalian target of rapamycin, and p70 S6 kinase signaling pathways." J Biol Chem **280**(3): 1838-48.
- Gerevich, Z. and P. Illes (2004). "P2Y receptors and pain transmission." Purinergic Signal **1**(1): 3-10.
- Gozdz, A., A. Habas, et al. (2003). "Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the neuroprotective activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 by cisplatin." J Biol Chem **278**(44): 43663-71.
- Grimes, C. A. and R. S. Jope (2001). "The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling." Prog Neurobiol **65**(4): 391-426.
- Habas, A., G. Kharebava, et al. (2006). "NMDA neuroprotection against a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor, LY294002 by NR2B-mediated suppression of glycogen synthase kinase-3beta-induced apoptosis." J Neurochem **96**(2): 335-48.
- Hardy, A. R., M. L. Jones, et al. (2004). "Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets." Blood **104**(6): 1745-52.
- Harris, T. J. and M. Peifer (2005). "Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription." Trends Cell Biol **15**(5): 234-7.
- Hervas, C., R. Perez-Sen, et al. (2003). "Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells." J Neurosci Res **73**(3): 384-99.
- Hervas, C., R. Perez-Sen, et al. (2005). "Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals." Biochem Pharmacol **70**(5): 770-85.
- Hetman, M., J. E. Cavanaugh, et al. (2000). "Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal." J Neurosci **20**(7): 2567-74.
- Hetman, M. and A. Gozdz (2004). "Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival." Eur J Biochem **271**(11): 2050-5.
- Hetman, M., K. Kanning, et al. (1999). "Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **274**(32): 22569-80.
- Hetman, M. and Z. Xia (2000). "Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins." Acta Neurobiol Exp (Wars) **60**(4): 531-45.
- Hibell, A. D., K. M. Thompson, et al. (2001). "Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs." J Pharmacol Exp Ther **296**(3): 947-57.
- Hollopeter, G., H. M. Jantzen, et al. (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." Nature **409**(6817): 202-7.
- Inoue, K., M. Tsuda, et al. (2005). "ATP receptors in pain sensation: Involvement of spinal microglia and P2X(4) receptors." Purinergic Signal **1**(2): 95-100.
- Jiang, L. H., A. B. Mackenzie, et al. (2000). "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors." Mol Pharmacol **58**(1): 82-8.

Summary

- Kim, Y. C., J. S. Lee, et al. (2005). "Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y₁₃ receptor." *Biochem Pharmacol* **70**(2): 266-74.
- King, B. F. T.-N., A (2003). "Nucleoside and nucleotide receptors." *Toxicol Rev* **23**: 1-11.
- Kucher, B. M. and J. T. Neary (2005). "Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor- α release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes." *J Neurochem* **92**(3): 525-35.
- Lafon-Cazal, M., V. Perez, et al. (2002). "Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells." *Eur J Neurosci* **16**(4): 575-83.
- Leon, D., C. Hervas, et al. (2006). "P2Y₁ and P2X₇ receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons." *Eur J Neurosci* **23**(11): 2999-3013.
- Leon, D., J. Sanchez-Nogueiro, et al. (2008). "Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X₇ receptors activation in cerebellar granule neurons." *Neurochem Int* **52**(6): 1148-59.
- Linseman, D. A., B. D. Butts, et al. (2004). "Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis." *J Neurosci* **24**(44): 9993-10002.
- Marteau, F., D. Communi, et al. (2004). "Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells." *J Leukoc Biol* **76**(4): 796-803.
- Miller, T. M., M. G. Tansey, et al. (1997). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells." *J Biol Chem* **272**(15): 9847-53.
- Neary, J. T. and Y. Kang (2005). "Signaling from P2 nucleotide receptors to protein kinase cascades induced by CNS injury: implications for reactive gliosis and neurodegeneration." *Mol Neurobiol* **31**(1-3): 95-103.
- Neary, J. T., M. McCarthy, et al. (1999). "Trophic signaling pathways activated by purinergic receptors in rat and human astroglia." *Prog Brain Res* **120**: 323-32.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-67.
- Novak, A. and S. Dedhar (1999). "Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf." *Cell Mol Life Sci* **56**(5-6): 523-37.
- Pap, M. and G. M. Cooper (1998). "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway." *J Biol Chem* **273**(32): 19929-32.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-83.
- Sanchez-Nogueiro, J., P. Marin-Garcia, et al. (2005). "Characterization of a functional P2X₇-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X₇ knockout mice." *FEBS Lett* **579**(17): 3783-8.
- Sellers, L. A., J. Simon, et al. (2001). "Adenosine nucleotides acting at the human P2Y₁ receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis." *J Biol Chem* **276**(19): 16379-90.
- Shinozaki, Y., S. Koizumi, et al. (2006). "Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes." *Glia* **54**(6): 606-18.
- Singer, C. A., X. A. Figueroa-Masot, et al. (1999). "The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons." *J Neurosci* **19**(7): 2455-63.

- Subramaniam, S., N. Shahani, et al. (2005). "Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway." *J Neurosci* **25**(11): 2838-52.
- Subramaniam, S., J. Strelau, et al. (2003). "Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways." *J Biol Chem* **278**(11): 8904-12.
- Van Kolen, K., K. Gilany, et al. (2006). "P2Y12 receptor signalling towards PKB proceeds through IGF-I receptor cross-talk and requires activation of Src, Pyk2 and Rap1." *Cell Signal* **18**(8): 1169-81.
- Virginio, C., D. Church, et al. (1997). "Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor." *Neuropharmacology* **36**(9): 1285-94.
- Wu, X., D. Zhu, et al. (2004). "AMPA protects cultured neurons against glutamate excitotoxicity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation in extracellular signal-regulated kinase to upregulate BDNF gene expression." *J Neurochem* **90**(4): 807-18.
- Yamagishi, S., T. Matsumoto, et al. (2003). "Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons." *Brain Res Mol Brain Res* **119**(2): 184-91.
- Young, M. T., P. Pelegrin, et al. (2007). "Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP." *Mol Pharmacol* **71**(1): 92-100.
- Zhang, F. X., R. Rubin, et al. (1998). "N-Methyl-D-aspartate inhibits apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cerebellar granule neurons. A role for insulin receptor substrate-1 in the neurotrophic action of n-methyl-D-aspartate and its inhibition by ethanol." *J Biol Chem* **273**(41): 26596-602.

INTRODUCCIÓN

1.- EL SISTEMA PURINÉRGICO.

1.1.- Los nucleótidos en el sistema nervioso. Papel en la neurotransmisión.

El ATP es una molécula que ejerce funciones indispensables para el mantenimiento celular. Intracelularmente, constituye la fuente de energía libre en el metabolismo, colabora en el mantenimiento de gradientes iónicos de membrana, en la regulación enzimática, síntesis de macromoléculas o en el trabajo mecánico. Además el ATP es el precursor, junto con otros nucleótidos de los ácidos nucleicos. El hecho de que la molécula de ATP sea incapaz de atravesar por sí misma la membrana plasmática debido a su gran tamaño y naturaleza iónica, unido a que es rápidamente hidrolizada por las ectonucleotidasas en el exterior de la célula, hicieron pensar que el ATP poseía funciones únicamente intracelulares. Esto provocó un gran retraso en el descubrimiento del importante papel de los nucleótidos como mensajeros extracelulares. Hoy en día se sabe que participan en multitud de procesos extracelulares entre los que destacan la contracción muscular, la respuesta inmune, la secreción endocrina y paracrina, la inflamación, la agregación plaquetaria, y dentro del Sistema Nervioso Central participan en funciones de neuroprotección, en el control central de funciones autónomas, en las interacciones neurona-glia, angiogénesis, regulación de la permeabilidad de microvesículas y en la traducción mecano sensorial (Burnstock, 2006) (Burnstock, 2005) (Gordon, 1986; Dubyak y el-Moatassim, 1993) (Burnstock, 1997).

El diverso rango de actividades extracelulares en las que intervienen las purinas se empezó a conocer con los trabajos de Drury y Szent-Györgyi en 1929 (Drury y Szent-Gyorgyi, 1929), que demostraron que la adenosina y los ácidos adenílicos (AMP, ADP y ATP) extraídos de corazón y músculo liso producían diversos efectos biológicos tales como la vasodilatación de las arterias coronarias y la disminución de la presión arterial. Posteriormente, se describieron acciones sobre otros tejidos, destacando el aumento de la motilidad intestinal y de la contracción uterina inducidos por el ATP (Deuticke, 1932) (Watts, 1953).

En los años posteriores se estudiaron las acciones del ATP en el sistema nervioso. Los estudios del grupo de Pamela Holton revelaron, aunque de forma indirecta, la posible participación del ATP como neurotransmisor. En estos trabajos se propuso al ATP como sustancia vasodilatadora liberada tras la estimulación de los nervios sensoriales del oído de conejo (Holton y Holton, 1953) (Holton y Holton, 1954) (Holton, 1959). Más tarde se observó que la aplicación de ATP en diversas zonas de cerebro producía cambios bioquímicos y electrofisiológicos (Galindo y cols., 1967). En la década de los 60 y 70 se realizaron una serie de investigaciones donde fue posible detectar, tras la estimulación de los nervios periféricos, la presencia de respuestas postsinápticas en presencia de antagonistas colinérgicos y adrenérgicos, postulándose la presencia de nervios no adrenérgicos no colinérgicos, o NANC. Posteriormente,

Burnstock determinó que el neurotransmisor liberado por estos NANC era el ATP, acuñando el término de “nervios y neurotransmisión purinérgica” (Burnstock y cols., 1970) (Burnstock y cols., 1972).

Jahr y Jessel darían en 1983 (Jahr y Jessell, 1983) la primera prueba directa de que el ATP mediaba respuestas extracelulares en el sistema nervioso, ya que registraron corrientes de entrada en neuronas del asta dorsal de la médula espinal tras la aplicación de ATP. Ese mismo año se observó el mismo efecto en neuronas de diversos ganglios sensoriales (Krishtal y cols., 1983). Desde estas primeras evidencias hasta hoy se ha demostrado que el ATP media la transmisión del dolor (Chen y cols., 1995), las sensaciones propioceptivas (Salter y cols., 1993), así como las corrientes postsinápticas excitadoras en secciones del núcleo de la habénula medial (Edwards y cols., 1992), en el asta dorsal de la médula espinal (Bardoni y cols., 1997) y en el hipocampo (Pankratov y cols., 1998). Estas junto con otras importantes funciones que hemos citado anteriormente indican que el ATP debe ser considerado como un verdadero neurotransmisor rápido en el sistema nervioso central.

1.2.- Almacenamiento, liberación y degradación de los nucleótidos.

El concepto de cotransmisión fue acuñado en los años 70 y postuló la idea de que una misma célula nerviosa podía almacenar y liberar diferentes tipos de neurotransmisores. De acuerdo con esto, la presencia de ATP en gránulos secretores ya había sido descrita previamente en estudios de gránulos cromafines de la médula adrenal bovina, donde estaba coalmacenado junto con la adrenalina y noradrenalina (Hillarp y cols., 1955) (Blaschko y cols., 1956) (Winkler, 1982). Igualmente los mastocitos y los basófilos son capaces de almacenar y liberar ATP junto con la histamina (Dubyak y el-Moatassim, 1993).

Las primeras evidencias de la presencia de ATP en el interior de vesículas sinápticas se obtuvieron en el órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Dowdall y cols., 1974) (Zimmermann y Denston, 1976) (Zimmermann, 1978). Posteriormente se describió la liberación de ATP en terminales colinérgicas, indicando que tras la exocitosis, la concentración que podía alcanzar el ATP en la hendidura sináptica era de valores cercanos a 100 μ M. (Richardson y Brown, 1987). El ATP también se encuentra almacenado junto con la acetilcolina y la noradrenalina en vesículas sinápticas de neuronas simpáticas y parasimpáticas (Westfall y cols., 1990) (von Kugelgen y Starke, 1991). En los últimos años se ha descrito asimismo la coliberación de ATP en terminales gabaérgicas, y glutamatérgicas (Jo y Schlichter, 1999) (Jo y Role, 2002) (Mori y cols., 2001). Esta liberación de ATP ha sido estudiada en terminaciones nerviosas centrales aisladas indicando que se produce de modo excitótico y dependiente de calcio (Sawynok y cols., 1993).

Además del ATP y otros nucleótidos clásicos se identificaron también derivados nucleotídicos y compuestos relacionados que eran almacenados en las vesículas secretoras. Entre ellos se encuentran los diadenosina polifosfatos (Ap_nA , $n=4-6$), que no sólo desarrollan un importante papel intracelular tanto en el núcleo como en el citosol (McLennan, 1992), sino que poseen importantes acciones extracelulares como neurotransmisores o neuromoduladores en el SNC y periférico (Pintor, 1993). Fueron detectados por primera vez almacenados en los gránulos cromafines junto con el ATP y otros neurotransmisores (Rodríguez del Castillo y cols., 1988) (Pintor y cols., 1991) (Pintor y cols., 1992). Estos dinucleótidos se encuentran en altas concentraciones en los gránulos densos de las plaquetas, donde se coalmacenan y coliberan junto con ADP, ATP y serotonina durante la agregación plaquetaria (Flodgaard y Klenow, 1982) (Luthje y Ogilvie, 1983). Igualmente se ha descrito su presencia en los mastocitos y en los basófilos coalmacenados junto con la histamina (Dubyak y el-Moatassim, 1993). Los diadenosina polifosfatos, especialmente el Ap_4A y el Ap_5A , también se han encontrado almacenados junto con el ATP, ADP y GTP en vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Pintor, 1992), y su exocitosis conjunta con el ATP en estudios realizados en terminaciones nerviosas de cerebro de rata apoyan el papel neurotransmisor de estos compuestos (Pintor y cols., 1993) (Pintor, 1993). Otro de los importantes papeles que se han descrito para los nucleótidos dentro de la transmisión nerviosa, es el de actuar como neuromoduladores, como se demuestra en los trabajos realizados en terminaciones nerviosas en los que tanto el ATP como los diadenosina polifosfatos ejercían un efecto regulador sobre la liberación de glutamato, acetilcolina y GABA (Gomez-Villafuertes y cols., 2001) (Gomez-Villafuertes y cols., 2003) (Gomez-Villafuertes y cols., 2004) (Diaz-Hernandez y cols., 2002) (Gualix y cols., 2003).

El almacenamiento de nucleótidos y dinucleótidos en vesículas pone de manifiesto la necesidad de un sistema transportador eficaz en contra de gradiente. Este transportador, del que ya se conocían algunas características funcionales y cinéticas, como la baja especificidad que permitía el transporte de una gran variedad de nucleótidos y dinucleótidos, al igual que su comportamiento mnemónico (Gualix y cols., 1997) (Gualix y cols., 1999), ha sido identificado recientemente como la proteína VNUT SLC17A9 (Sawada y cols., 2008). Se trata de una isoforma de la familia de transportadores SLC17 con 12 segmentos transmembrana y 430 aminoácidos, identificada tanto en humano como en ratón, y muy asociada a cerebro y medula adrenal, que juega un papel vital en el almacenamiento y liberación de nucleótidos.

Lo indicado anteriormente hace referencia a la liberación de nucleótidos y dinucleótidos, por medio de exocitosis, de forma semejante a la de los neurotransmisores clásicos. Sin embargo existen múltiples evidencias en otros muchos tipos celulares, como células endoteliales, musculares y gliales, de liberación no exocitótica en respuesta a estímulos como la hipoxia, inflamación o estrés mecánico (Bodin y Burnstock, 2001). La forma más obvia de liberación no exocitótica de nucleótidos, es la que se produce tras el daño tisular. Las altas concentraciones

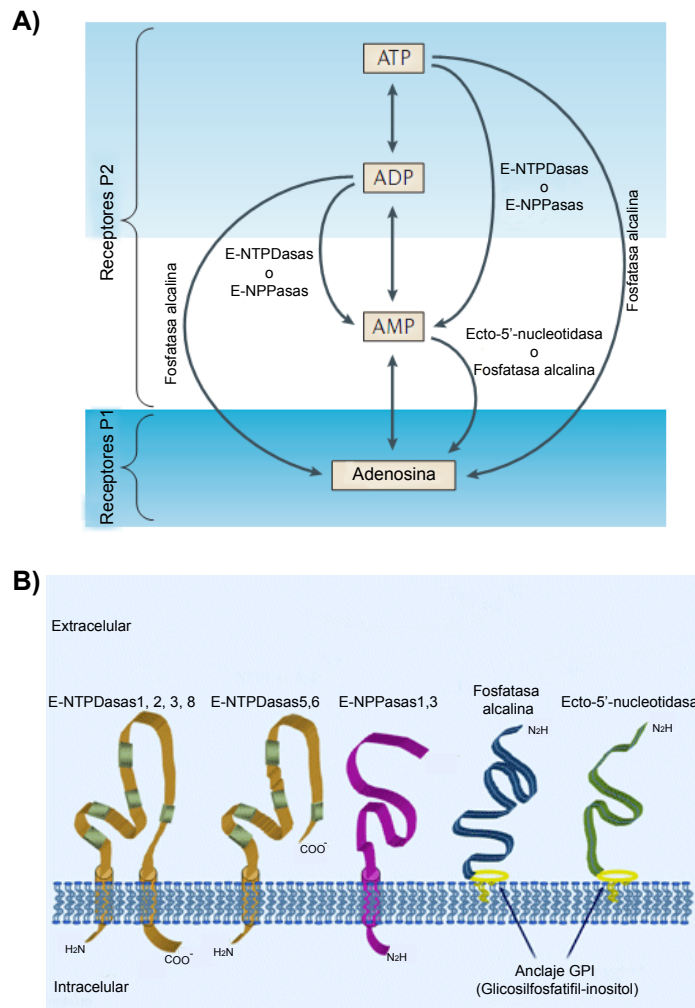


Figura 1.- Liberación y metabolismo de los nucleótidos. A) Una vez liberados al espacio extracelular por exocitosis o a través de transportadores los nucleótidos activan receptores P2Y y P2X. Su acción finaliza por actuación de las ectonucleotidasas, que degradan los nucleótidos trifosfato hasta adenosina, pudiendo generar nucleótidos difosfato que a su vez siguen activando otros receptores P2. Por último se produce adenosina que activa por su parte a sus propios receptores, siendo finalmente recaptada para la síntesis de nuevos nucleótidos. B) Esquema estructural de algunos miembros de la familia de las E-NTPDasas, E-NPPasas, de la fosfatasa alcalina y de la ecto-5'-nucleotidasa. Figuras modificadas de (Fields y Burnstock, 2006) y de los esquemas del doctor J. Sévigny del CRRI.

intracelulares de los nucleótidos (rango mM) hace que sean liberados en grandes cantidades al espacio extracelular tras la ruptura de la membrana plasmática, donde median diversas acciones en procesos de inflamación y posterior recuperación tisular.

Los mecanismos implicados en la liberación no exocitótica no están totalmente identificados aunque se ha postulado que podrían estar mediados por una serie de transportadores o canales que formarían parte de la superfamilia de proteínas ABC (“ATP Binding Casette”). Hoy día, es la familia conocida como ABCC la que parece la candidata más plausible. Esta familia contiene por el momento 7 genes ABCC (1-7), y las funciones y propiedades de algunas de estas proteínas son aún desconocidas. Entre sus miembros se encuentran los transportadores ABCC4 (MRP₄) y ABCC5 (MRP₅), que transportan fuera de la célula nucleótidos cíclicos,

AMPC y GMPc. Otras hipótesis sugieren la participación de canales iónicos dependientes de voltaje, conexinas y otros miembros de las uniones estrechas entre células en este tipo de liberación (Buettner y cols., 2000) (Eltzschig y cols., 2006) (Solsona, 2004) (Bahima y cols., 2006). Tampoco podemos olvidar que el UTP, UDP y UDP-glucosa son compuestos funcionales en el Golgi y el grupo del Dr. Boucher ha propuesto su salida mediante exocitosis constitutiva como excedente de la funcionalidad del Golgi (Lazarowski, 2004) (Lazarowski, 2006).

Como todos los neurotransmisores, una vez liberados y cumplida su misión deben ser inactivados, degradados o retirados del medio extracelular. Los nucleótidos se degradan mediante una cascada de enzimas extracelulares que conducen a la formación del nucleósido correspondiente y del fosfato, que pueden ser reutilizados posteriormente por las células adyacentes (Pastor-Anglada y cols., 1998). Las enzimas encargadas de esta degradación de los nucleótidos se denominan ecto-nucleotidasas (Zimmermann, 2000) (Robson y cols., 2006), y generan, como último paso de la cadena, el nucleósido adenosina, que puede ejercer sus propias acciones a través de sus receptores, siendo posteriormente recapturada mediante un transportador de alta afinidad (Sen y cols., 1999).

Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos, con especial abundancia en aquellos capaces de liberar nucleótidos, y actúan de manera concertada o consecutiva. La localización de las distintas familias de enzimas ecto-nucleotidasas se ha llevado a cabo recientemente en cerebro de roedores (Langer y cols., 2008). Normalmente se encuentran ancladas a la membrana con su dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular, aunque también se han descrito formas solubles que aparecen en el medio extracelular como consecuencia de su liberación a partir de vesículas sinápticas o, como en el caso de la ecto-5'-nucleotidasa, como resultado de la hidrólisis de su anclaje a la membrana (Todorov y cols., 1997). La degradación secuencial mediada por estas enzimas no sirve únicamente para la inactivación de los nucleótidos, sino que genera intermediarios activos que pueden mediar sus propias acciones en el exterior celular, como es el caso del ADP que se forma como resultado de la hidrólisis del ATP y que puede actuar sobre receptores que reconocen específicamente nucleótidos difosfato.

Las enzimas ecto-enzimas se clasifican en las siguientes familias (Ver tabla 1):

- La familia de las **ecto-nucleótidotrifosfo/difosfo-hidrolasas (E-NTPDasas)**. También conocidas con otros nombres como: ecto-ATPasa, ecto-ADPasa, ecto-apirasa o CD39. Hidrolizan tanto nucleótidos trifosfato como difosfato, sin tener una especial preferencia por la base púrica o pirimidínica (Zimmermann, 1994) (Zimmermann, 1996) (Zimmermann, 2000). Hoy en día se han identificado hasta 8 tipos diferentes (Robson y cols., 2006), de los cuales únicamente los miembros NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3 y NTPDasa8 poseen papeles relevantes en el control de la señalización purinérgica (Kukulski y cols., 2005).

- La familia de las **ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPPasas)**. Se encargan de hidrolizar enlaces fosfodiéster. Tanto los nucleótidos de purinas como los de pirimidinas podrían servir de sustrato. El producto contiene siempre un NMP y PPi. También pueden hidrolizar el enlace fosfodiéster de los dinucleótido polifosfato (Gasmi y cols., 1998), de coenzimas, como la NAD^+ , y lisofosfolípidos (Umezu-Goto y cols., 2002) (Tokumura y cols., 2002). Hasta el momento se han clonado 7 miembros de esta familia (Stefan y cols., 2006).

- La **ecto-5'-nucleotidasa**, también denominada CD-73, es una enzima de la que sólo se conoce un gen y que cataliza la etapa final de la reacción de hidrólisis generando el correspondiente nucleósido y el fosfato inorgánico. Tiene preferencia por nucleótidos como el AMP y el GMP más que por los nucleótidos de pirimidina.

- La **ecto-fosfatasa alcalina**, es la enzima con menor especificidad que se encarga de liberar

Ecto-Nucleotidasas		Reacción catalizada
<i>Familia Ecto-NTPDasa</i>		
	<i>Sustrato preferente</i>	
NTPDasa 1 (Ecto-ATPDasa, CD39)	NTP ~ NDP	NTP → NMP + 2Pi
NTPDasa 2 (Ecto-ATPasa, CD39L1)	NTP >>> NDP	
NTPDasa 3 (Ecto-ATPDasa, CD39L3)	NTP > NDP	NDP → NMP + Pi
NTPDasa 4 (UDPasa)	UDP > GDP > CDP	
NTPDasa 5 (ER-UDPasa, PCPH, CD39L4)	UDP > GDP > CDP	
NTPDasa 6 (CD39L2)	GDP > IDP > UDP	
NTPDasa 7 (LALP1)	UDP, GDP, CDP	
NTPDasa 8 (Liver Canalicular ecto-ATPasa)	NTP > NDP	
<i>Familia Ecto-NPPasa</i>		
NPPasa 1,2,3,4,5,6,7		$\text{Np}_n\text{A} \rightarrow \text{NMP} + \text{Ap}_{(n-1)}$
<i>Ecto-5'-nucleotidasa</i>		NMP → Nucleósido + Pi
<i>Ecto-fosfatasa alcalina</i>		NTP → NDP → AMP → Nucleósido + 3Pi

Tabla 1. Familias de ecto-nucleotidasas (tomado de Robson y cols, 2006).

fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos, entre los que se incluyen los nucleósido 5'-tri-, -di- y -monofosfato (Zimmermann, 2000). En presencia de altas concentraciones de aceptores de fosfato puede hidrolizar PPi y catalizar reacciones de transfosforilación.

1.3.- Receptores de nucleótidos.

Los nucleótidos liberados al medio extracelular median sus acciones a través de la activación de receptores específicos de membrana cuya clasificación detallaremos en este apartado.

La primera clasificación de los receptores de nucleótidos y nucleósidos fue llevada a cabo en 1978 por Burnstock en función de las características farmacológicas y de la acción mediada por la activación del receptor. Así se definió a los receptores P1 o receptores de adenosina como activados por adenosina, antagonizados por las metilxantinas y moduladores de la actividad de la adenilato ciclasa, mientras que los P2 o receptores de ATP, eran los activados por ATP y ADP e insensibles a las metilxantinas (Burnstock, 1978). En 1985 se propuso la clasificación farmacológica de los receptores P2 en dos subfamilias P2X y P2Y (Burnstock y Kennedy, 1985), y en los años posteriores se propusieron nuevos receptores como el P2T, selectivo para ADP en plaquetas, el P2Z en macrófagos (Gordon, 1986) y el P2U que reconocía UTP además de ATP (O'Connor y cols., 1991). Finalmente todos estos receptores quedarían agrupados en receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbracchio y Burnstock, 1994) (Ralevic y Burnstock, 1998). Hasta la fecha se han clonado 7 subunidades de los receptores P2X, cuya nomenclatura, anteriormente P2X₁₋₇ ha sido actualizada recientemente por el Comité de Nomenclatura de la IUPHAR a P2X1-7 (Collingridge y cols., 2009). Por su parte los receptores P2Y cuentan con ocho miembros (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄), cuya nomenclatura aún no ha sido actualizada.

La identificación y caracterización de los receptores P2 no resulta una tarea sencilla. Los principales problemas que se plantean a la hora del estudio de estos receptores son los siguientes:

1. La falta de disponibilidad de agonistas y antagonistas específicos y potentes para diferenciar bien los distintos subtipos, por lo que se produce el solapamiento de acciones debidas a la activación de distintos receptores co-expresados en un mismo tejido y que pueden estar siendo activados o inhibidos por el mismo ligando.

2. Los agonistas nucleotídicos comerciales, pueden presentar contaminación por otros nucleótidos.
3. La co-expresión de varios subtipos de receptores en el mismo tejido o tipo celular. La mayoría de los estudios de caracterización de los receptores de nucleótidos se han llevado a cabo en sistemas de expresión heterólogos, sin tener en cuenta la situación real “in vivo” donde conviven varios tipos de receptores que, además, pueden interaccionar entre sí. Igualmente, estos receptores pueden formar homo o heterooligómeros variando sus características farmacológicas.
4. La acción de las enzimas ectonucleotidasas y nucleotidasas solubles presentes en la superficie celular o liberadas al medio, que pueden degradar o transformar los agonistas o antagonistas utilizados.
5. La liberación tónica de nucleótidos por parte de las células, que puede originar desensibilización o interferir en las respuestas de los receptores.

Además de estas consideraciones, los receptores de nucleótidos, como sucede a la mayoría de los receptores, no pueden ser analizados en solitario, sino dentro del contexto del microambiente donde están situados, teniendo en cuenta las interacciones que poseen con otras proteínas a nivel de membrana, lo que contribuye a la heterogeneidad de respuestas encontradas entre los distintos tipos celulares. A este conjunto es a lo que se ha venido a denominar “receptosoma”, y en el caso de los receptores de nucleótidos, “purinoma”, que sería el complejo molecular responsable de los efectos biológicos de los ligandos purinérgicos extracelulares, que incluye, no sólo a los receptores P2 de nucleótidos, sino también a las enzimas ectonucleotidasas, los receptores P1 de adenosina, los transportadores de nucleósidos y los canales y transportadores de nucleótidos (Volonte y D'Ambrosi, 2009).

Todo esto, en conjunto ha hecho que aunque haya sido posible encontrar en los tejidos nativos receptores análogos a algunos de los receptores P2 clonados (coincidiendo en la distribución, los mecanismos de señalización y la farmacología), en la mayoría de los casos no se haya podido establecer una correspondencia inequívoca. Por ello, se tiende a calificar a los receptores endógenos con el sufijo anglosajón “-like” (“P2X₁-like”, “P2Y₂-like”, etc.) hasta que se apliquen criterios posteriores que corroboren su identificación.

1.4.- Receptores ionotrópicos P2X.

Los receptores P2X son canales iónicos activados por ligando que median la despolarización de la membrana por la entrada de cationes de pequeño tamaño como Ca^{2+} , Na^{+} o K^{+} , y que se activan por la unión del ATP extracelular (North, 2002). Estos receptores están expresados a lo largo de todo el organismo y median multitud de procesos que van desde la transmisión sináptica excitatoria rápida hasta la coagulación sanguínea.

Desde la década de los 90 se han identificado 7 subunidades de receptores P2X diferentes, desde P2X1 a P2X7. Estas subunidades no son funcionales por sí solas y se ensamblan en trímeros formando homo- o hetero-oligómeros para dar lugar a canales funcionales (Nicke y cols., 1998). Igualmente, se han identificado los siete genes que codifican para estas subunidades. Las subunidades P2X4 y P2X7 se encuentran codificadas en el mismo cromosoma, concretamente en el brazo largo del cromosoma 12 humano. Lo mismo sucede con las subunidades P2X1 y P2X5 en el brazo corto del cromosoma 13, mientras que el resto de subunidades se encuentran localizadas en cromosomas diferentes. El descubrimiento de nuevas isoformas de estas subunidades ha aumentado la diversidad de esta familia de receptores. Este es el caso de las isoformas identificadas como consecuencia del procesamiento diferencial en cerebelo de rata, cóclea y pituitaria, del receptor P2X2 (Simon y cols., 1997) (Housley y cols., 1998) (Lynch y cols., 1999). También se han detectado variantes para los receptores P2X1 (Hardy y cols., 2000), P2X4 (Dhulipala y cols., 1998), P2X5 (Le y cols., 1997), P2X6 (Urano y cols., 1997) y P2X7, del que se han detectado hasta la fecha 8 variantes de splicing que pueden variar las características estructurales y funcionales del receptor. (Cheewatrakoolpong y cols., 2005) (Feng y cols., 2006). Igualmente se han descrito numerosos polimorfismos para el P2X7 que afectan a la actividad funcional y a su señalización. En este sentido, cambios en aminoácidos clave del P2X7 en linfocitos están asociados a una pérdida de función y a una menor sensibilidad a la muerte de estas células en determinados pacientes de leucemia. Por otro lado, la pérdida de función del receptor asociada a otros polimorfismos disminuye la función de los macrófagos en la muerte del microorganismo patógeno (Cabrini y cols., 2005) (Gu y cols., 2004) (Fernando y cols., 2007) (Shemon y cols., 2006) (Sellick y cols., 2004) (Young y cols., 2006). Aunque la mayoría de estas variantes no son funcionales por sí mismas, su presencia junto con otras subunidades puede alterar la función de otros receptores (Feng y cols., 2006) o formar un fenotipo diferente. La presencia de estas múltiples variantes de las subunidades pertenecientes a esta familia de receptores, así como la posibilidad de formar distintos hetero-oligómeros, como veremos más adelante, contribuye a explicar la gran heterogeneidad observada *in vivo* en las respuestas de estos receptores, al igual que las diferencias existentes entre los receptores endógenos y los expresados *in vitro*.

1.4.1.- Estructura de las subunidades P2X.

Los receptores P2X pertenecen a una clase estructural de canales iónicos activados por ligando diferente a la de otras familias de receptores, como los de glutamato (Brake y cols., 1994) (Valera y cols., 1994) (Surprenant y cols., 1995). Las subunidades P2X varían entre los 379 aminoácidos de la subunidad P2X6 y los 595 de la subunidad P2X7, y están organizados en dos segmentos transmembrana. El primero de estos segmentos transmembrana (TM1), tomando como referencia la estructura del receptor P2X1, se extiende desde el aminoácido 30 del extremo amino terminal hasta el 50, mientras que el segundo (TM2) se sitúa desde el residuo 330 hasta el 353. Tanto el extremo amino terminal como el carboxilo terminal son citosólicos. El extremo N-terminal es de una longitud similar en todas las subunidades y presenta entre 24 y 31 aminoácidos, mientras que el extremo C-terminal es mucho más variable. En el caso de las subunidades P2X1, 3, 4, 5 y 6, presenta un tamaño más corto, contando el P2X6 con únicamente 27 aminoácidos. La subunidad P2X2 en cambio muestra un extremo C-terminal de 120 aminoácidos, involucrado en la interacción con otros receptores, como los de serotonina, los canales nicotínicos $\alpha_4\beta_2$ y los de rho1/GABA (Barajas-Lopez y cols., 2002) (Boue-Grabot y cols., 2004; Khakh y cols., 2005), mientras que la P2X7 alcanza 240 aminoácidos y posee en este extremo numerosas secuencias para la interacción con otras proteínas (Kim y cols., 2001) (Murrell-Lagnado y Qureshi, 2008). Aproximadamente entre el 50 y el 70% de la estructura de estas subunidades, lo forma un bucle extracelular situado entre los dos segmentos transmembrana. Este bucle posee alrededor de 280 aminoácidos, 93 de los cuáles se encuentran altamente conservados en, al menos, 6 subunidades P2X y podrían participar en la unión del ligando (Vial y cols., 2004a). En esta región se encuentran también altamente conservadas 10 residuos de cisteína que contribuyen a la estabilización de la estructura terciaria de las proteínas a través de la formación de puentes disulfuro. El dominio extracelular de los receptores cuenta también con numerosos sitios de glicosilación necesarios para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y para la regulación de la potencia del ligando (Torres y cols., 1998) (Hu y cols., 2002) (Rettinger y cols., 2000).

Como se muestra en la figura 2, perteneciente al esquema de la subunidad P2X1, los residuos cargados positivamente Lys68, Arg292 y Lys309, cercanos al vestíbulo del poro iónico, serían los responsables de la unión de los fosfatos de ATP, aunque no resultarían esenciales para las acciones mediadas por el ligando (Ennion y cols., 2000) (Jiang y cols., 2000b). A su vez, el ATP, generalmente está asociado con el magnesio en el medio extracelular, por lo que los residuos cargados negativamente podrían contribuir a la unión del ATP vía su interacción con el magnesio. Los aminoácidos aromáticos están asociados al reconocimiento de nucleótidos en proteínas de unión a ATP (Tanner y cols., 2003). Estos aminoácidos presentes también en el dominio extracelular (Phe185 y Phe291) serían responsables de coordinar la unión del anillo de adenina del ATP (Roberts y Evans, 2004). El aminoácido Asn290 también parece ser importante y colaborar en la unión del ATP (Roberts y Evans, 2007). Es importante tener en cuenta que

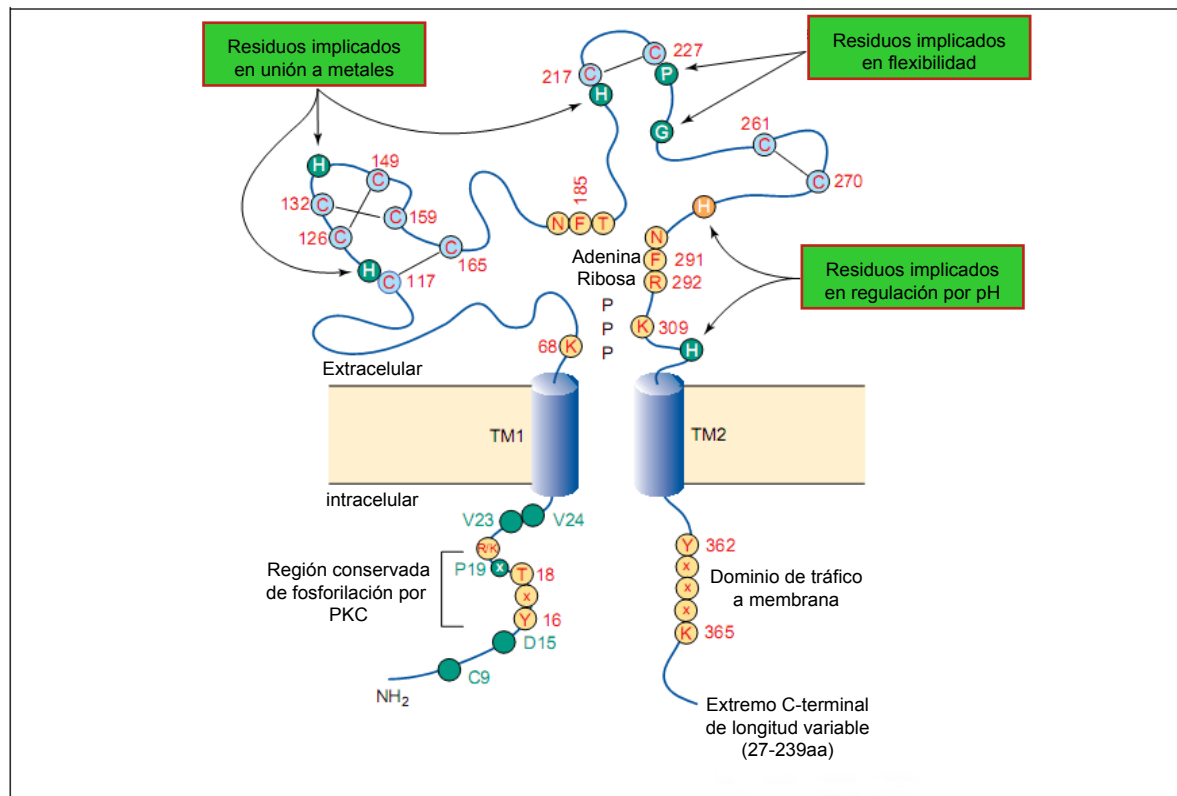


Figura 2.- Modelo estructural de la subunidad P2X1. Se muestra los extremos C y N-terminal, el dominio extracelular y los dominios transmembrana (TM1 y TM2). Los aminoácidos conservados se muestran en rojo, mientras que los verdes o naranjas corresponden a los aminoácidos identificados por mutagénesis en P2X2 y P2X4. Se muestra la región conservada de interacción con PKC en el extremo N-terminal y la región presente en el extremo C-terminal, de longitud variable, que está implicada en el transporte a membrana. Igualmente aparecen indicados los aminoácidos implicados en el reconocimiento de ATP, regulación por PH, por metales o en los cambios conformacionales del receptor (flexibilidad). Imagen modificada de Vial y cols, 2004.

existen diferencias estructurales entre subunidades, lo que origina las diferencias farmacológicas que pueden darse como consecuencia de la interacción entre las zonas conservadas de los P2X y las regiones más específicas de cada subunidad. Esto supone un ajuste mucho más fino de las características de cada subunidad (Roberts y cols., 2006).

1.4.2.- Oligomerización de las subunidades P2X.

Los dos segmentos transmembrana que presentan las subunidades P2X no son capaces, por sí mismos, de formar un poro iónico, lo que sugiere que las distintas subunidades se asocian para formar un canal funcional. No se ha determinado aun el dominio que controla la especificidad en las interacciones entre subunidades, ya que las imágenes de alta resolución obtenidas por el sistema ASIC muestran múltiples interacciones entre subunidades. En estas interacciones está particularmente involucrada la lámina β situada en los ectodominios y dominios transmembrana, siendo menor la participación de los extremos N y C-terminal (Torres y cols., 1999), aunque

Introducción

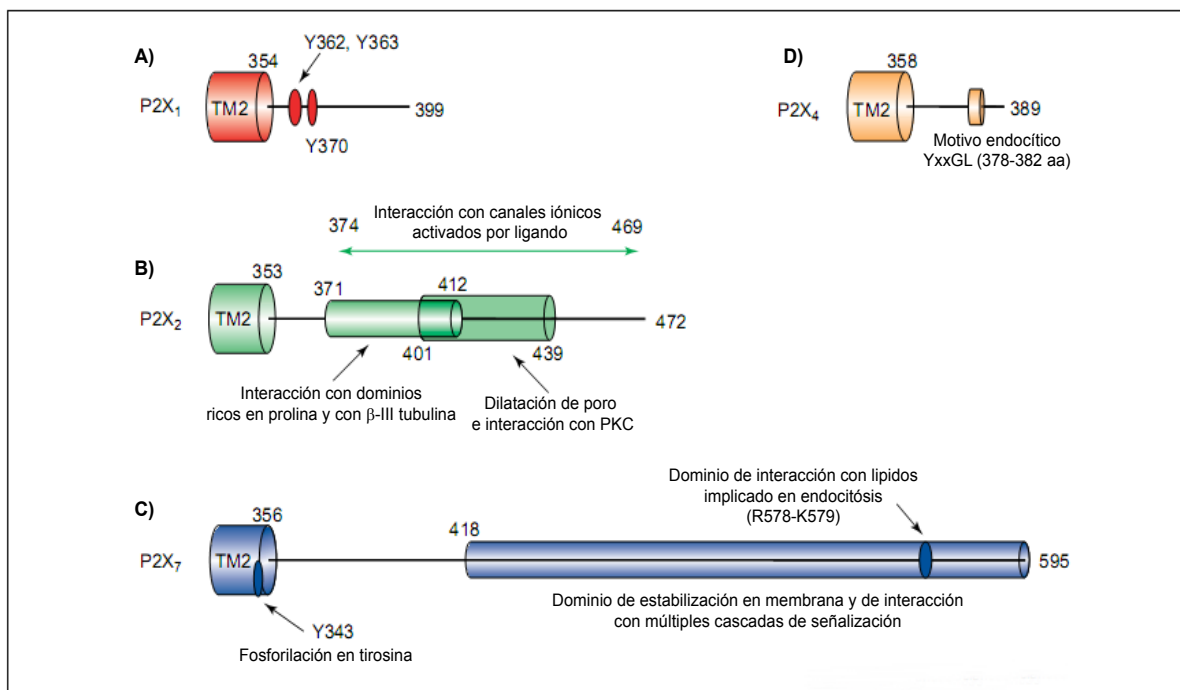


Figura 3.- Diversidad y funcionalidad del dominio C-terminal intracelular de las subunidades P2X. Representación del dominio TM2 y del extremo C-terminal de los receptores P2X₁, P2X₂, P2X₄ y P2X₇, indicándose los dominios o residuos implicados en sus distintas funciones. Imagen modificada de Vial y cols, 2004.

esto puede variar en función de las distintas subunidades.

En cuanto al número de subunidades necesarias para la formación de un canal funcional, los estudios dirigidos en esta dirección detectaron que estos receptores se agrupaban en trímeros (Nicke y cols., 1998) (Aschrafi y cols., 2004) (Nagaya y cols., 2005). Los últimos estudios realizados utilizando microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica, sistemas de imagen ASIC, o por medio de la utilización de anticuerpos que permiten observar la conformación de las subunidades, han determinado que la estructura coincide con un trímero, en forma de pirámide invertida y con un volumen de 409 nm³, próximo a lo esperado para un receptor trimérico (473 nm³) (Barrera y cols., 2005) (Nakazawa y cols., 2005) (Mio y cols., 2005) (Jasti y cols., 2007).

Cada una de las subunidades de los P2X puede ensamblar entre sí para formar homómeros compuestos por subunidades idénticas, aunque en el caso de las subunidades P2X₅ y P2X₆, esta interacción presenta mayor dificultad (King y cols., 2000) (Wildman y cols., 2002) (Barrera y cols., 2005). Las distintas subunidades pueden interaccionar entre sí, a través del segundo dominio transmembrana TM2, para formar heterooligómeros, como se muestra en la figura 5 (Torres y cols., 1999) habiéndose descrito heterooligómeros P2X₁/P2X₂, P2X₁/P2X₄, P2X₁/P2X₅, P2X₂/P2X₃, P2X₂/P2X₆, P2X₄/P2X₅, P2X₄/P2X₆ (Roberts y cols., 2006). Una mayor controversia aparece con respecto a la subunidad P2X₇, de la que durante mucho tiempo se ha postulado que únicamente formaba homooligómeros. En los últimos años se han llevado a cabo estudios que indican que las subunidades P2X₄ y P2X₇ podrían coensamblar y formar

A) ESTRUCTURA TRIMERICA PROPUESTA PARA LOS P2X

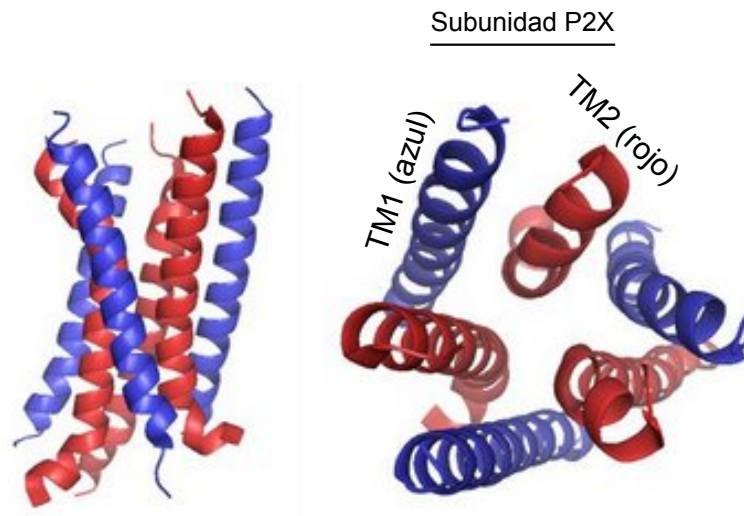


Imagen AFM para el P2X2

B)

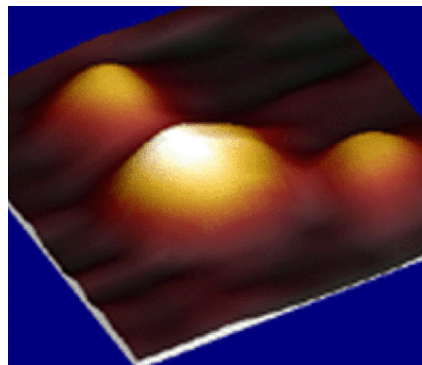


Figura 4.- Estructura de los receptores P2X. A) Disposición de los dominios transmembrana en la estructura trimerica propuesta para los P2X y basada en la estructuras descritas para los canales ASIC1 por (Jasti y cols., 2007). B) La imagen de microscopía de fuerza atómica (AFM) tomada de la página web del departamento de farmacología de la Universidad de Cambridge muestra un receptor P2X2 unido a dos moléculas de anticuerpo específico para este receptor (partículas más pequeñas). El ángulo formado entre las dos moléculas de anticuerpo y el receptor es de 120° lo que indica que el receptor está formado por 3 subunidades. La imagen corresponde a un tamaño de 30 nm cuadrados.

interacciones funcionales (Guo y cols., 2007), aunque otros trabajos en varios tejidos indican que estos trímeros no son estables o no representan un porcentaje significativo en los modelos estudiados (Nicke, 2008).

Como hemos indicado anteriormente en este apartado, las características farmacológicas vienen determinadas por las subunidades que forman el receptor. En estos receptores heteroméricos las características pueden venir determinadas por una de las subunidades que lo forman, o ser una combinación de las características de las distintas subunidades integrantes del receptor. De la misma forma, es muy usual que en el mismo tejido o tipo celular se coexpresen diversas subunidades P2X sin que se conozca con exactitud la composición de los receptores

endógenos. Igualmente, durante el desarrollo se producen cambios en la expresión de las distintas subunidades en distintos órganos o sistemas, como en el sistema nervioso, el tracto intestinal, la cóclea, el hígado, o las células del sistema inmune (Xiang y Burnstock, 2005a) (Giaroni y cols., 2006) (Huang y cols., 2006) (Xiang y cols., 2006b) (Heine y cols., 2007).

1.4.3.- Características funcionales de los receptores P2X.

Los diferentes receptores P2X pueden ser diferenciados en función de su respuesta, de su afinidad por agonistas y antagonistas, y de su sensibilidad a la modulación por determinados elementos como el Ca^{2+} y Mg^{2+} extracelulares, los protones o el zinc (Roberts y cols., 2006). (tabla tal de Roberts). La estimulación de los receptores P2X produce la entrada rápida, en orden de milisegundos, y no selectiva de cationes Ca^{2+} , Na^+ o K^+ , siendo además el receptor P2X5 selectivamente permeable al Cl^- (Bo y cols., 2003). La permeabilidad relativa para cada uno de estos iones varía en función de la subunidad P2X implicada. La apertura del canal genera la despolarización de la membrana y la duración de la respuesta varía en función del receptor implicado. En este sentido los receptores P2X1 y P2X3 son los que más rápido pierden la

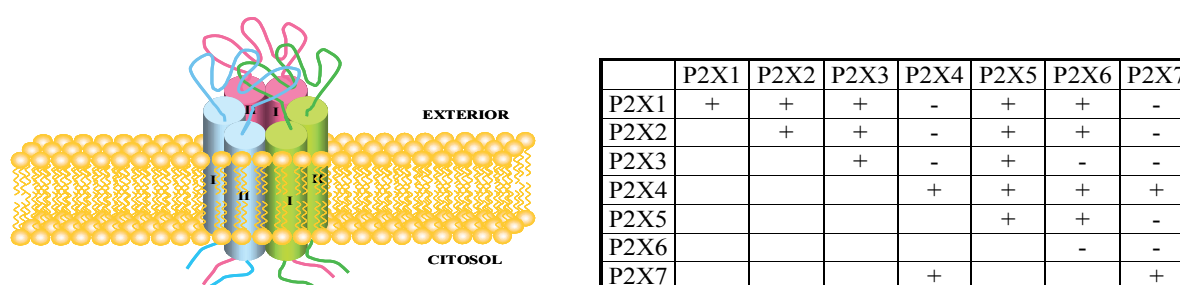


Figura 5.- Posibles combinaciones en los receptores P2X heterotriméricos. La tabla indica las distintas subunidades que se combinan para dar lugar a la estructura trimérica del receptor P2X, como vemos en la representación esquemática. Es importante destacar que aunque en la figura aparecen tres subunidades diferentes, hasta ahora sólo se han identificado heterotrimeros formados por 2 subunidades distintas. Los datos han sido obtenidos de obtenidos de Torres y cols, 1999 y Guo y cols 2007.

respuesta en presencia continuada del agonista (desensibilización), cayendo dicha respuesta en un 90% en 1-2 segundos. Esta desensibilización se produce como consecuencia de la formación de una forma cerrada unida al agonista, requiriéndose varios minutos de lavado para recobrar la funcionalidad completa (Rettinger y Schmalzing, 2003). Las respuestas de los otros receptores P2X son mucho más sostenidas, situándose en el extremo contrario el receptor P2X7, cuya respuesta se mantiene durante minutos (North, 2002).

Los estudios de la apertura del canal y la conductividad de iones en estos receptores, indican

que ambos dominios transmembrana colaboran en la formación del poro iónico, e igualmente han sido identificados los residuos que dirigen la conducción iónica (Egan y cols., 2004). Las variaciones de las corrientes generadas por los diferentes receptores se deben a diferentes aperturas del poro iónico y están mediadas por residuos tanto del dominio extracelular, como de los dominios transmembrana e intracelular. Otros estudios han determinado que en particular tres aminoácidos del TM1 (Ile44, Cis45, Met49), cercanos a la zona extracelular, contribuyen a la regulación de la apertura del canal como consecuencia de la unión del ligando (Haines y cols., 2001). El dominio intracelular también colabora en la regulación de la apertura del canal y la permeabilidad iónica, por ejemplo las mutaciones que eliminan la secuencia de unión a PKC, presente en la zona N-terminal del receptor y que se encuentra constitutivamente fosforilada, puede aumentar la velocidad de desensibilización en ciertas isoformas. Esto pone de manifiesto que el extremo N-terminal participa directamente en la regulación de la conductividad iónica a través de estos canales (Boue-Grabot y cols., 2000) (Ennion y Evans, 2002) (Liu y cols., 2003). En cuanto al extremo C-terminal, conserva en todas las isoformas un motivo YxxxxK, cercano al TM2 que está asociado al correcto transporte del receptor a la membrana, y a la internalización y mantenimiento de su expresión en la superficie celular (Chaumont y cols., 2004) (Bobanovic y cols., 2002). Esta región también participa en la estabilidad de la apertura del canal (Zemkova y cols., 2004) (Stojilkovic y cols., 2005), y estudios de mutagénesis sugieren también que puede estar relacionada con la regulación de la apertura en sí y de las propiedades del poro de estos receptores (Eickhorst y cols., 2002).

1.4.4. Modulación de los receptores P2X

Los receptores P2X están modulados alostéricamente por los protones extracelulares, los cationes divalentes y una variedad de metales, como el Cu^{2+} y el Zn^{2+} (Brown y cols., 2002). La regulación por el pH parece estar mediada por los residuos de histidina cercanos a la región asociada a la unión del ATP, como los residuos His319 y His286 del receptor P2X2 de ratón y P2X4 de humano, respectivamente (Clyne y cols., 2002a) (Clarke y cols., 2000), o los residuos His62 y Asp197 en el ectodominio del receptor P2X7 de rata (Liu y cols., 2008a). Los puentes disulfuro altamente conservados en la región extracelular participan en la regulación que el zinc ejerce sobre receptores como el P2X2 (Clyne y cols., 2002b). Además, determinados residuos de histidina del dominio extracelular, como la His140 del receptor P2X4, participan también en la acción reguladora del cobre sobre estos receptores (Coddou y cols., 2003). Los residuos His85 y 219, Lis110 y 137 y sobre todo, Asp197, participan asimismo en la inhibición del receptor P2X7 por parte del cobre y el zinc (Liu y cols., 2008b).

La unión del ligando produce, en ocasiones, cambios conformacionales en los receptores (Jin y cols., 2003). Es muy posible que movimientos semejantes se den en el dominio extracelular de los P2X y coordinen la unión de alta afinidad de los grupos adenina y trifosfato del ATP a estos receptores, lo que explicaría la selectividad de los P2X por determinados ligandos. En varios

receptores P2X, existen residuos conservados de prolina y glicina en la región extracelular, que podrían dotar de flexibilidad y estar implicados en cambios conformacionales del dominio extracelular con respecto a la unión del agonista (Nakazawa y Ohno, 1999) (Nakazawa y cols., 2004).

Los receptores P2X también pueden modularse a través de acciones sobre su dominio intracelular. Las fosforilaciones en serina, treonina o tirosina en determinadas zonas de este dominio intracelular P2X resulta un importante mecanismo de regulación de la actividad de los receptores. El extremo N-terminal, como hemos indicado anteriormente, presenta una zona de interacción con PKC, que fosforila residuos de Treonina regulando la desensibilización de los receptores, como en el caso del P2X2 o el P2X1 (Toth-Zsamboki y cols., 2002) (Ennion y Evans, 2002) (Boue-Grabot y cols., 2000). Igualmente en el extremo N-terminal se encuentran residuos de Tirosina altamente conservados, cuya alteración por medio de estudios de mutagénesis en el receptor P2X1 suponen una alteración importante, disminuyendo o anulando completamente la funcionalidad del receptor (Toth-Zsamboki y cols., 2002). Otro residuo que resulta fosforilado es el de Tyr343, que se encuentra en la zona de transición entre el TM2 y el C-terminal del P2X7, y su defosforilación tras la activación del canal lleva a una reducción de la duración de la respuesta (Kim y cols., 2001). Los receptores P2X también pueden verse regulados por fosforilaciones y defosforilaciones llevadas a cabo por quinasas y fosfatasas, como por ejemplo, la PKA, que inhibe el P2X2 (Chow y Wang, 1998), la CaMKII que potencia la respuesta a ATP aumentando el tráfico de receptores (Xu y Huang, 2004), la propia PKC activada por otros receptores (Boue-Grabot y cols., 2000) o la defosforilación, implicada en la activación tras el reconocimiento del ligando, llevada a cabo por la tirosina-fosfatasa (RPTP β) sobre el receptor P2X7 (Kim y cols., 2001).

La actividad de otros receptores puede modular igualmente la respuesta de los receptores P2X, como es el caso de determinados receptores acoplados a proteínas G. Entre ellos se encuentran los receptores de serotonina, glutamato (mGluR1 α), y los propios receptores nucleotídicos P2Y₁ y el P2Y₂, que modulan el receptor P2X1. El receptor P2Y₁ es capaz de inhibir al receptor P2X3, facilitando su desensibilización, vía proteínas G, en neuronas del ganglio dorsal de médula espinal y en células HEK293 (Gerevich y cols., 2005) (Gerevich y cols., 2007). También modulan a estos receptores los canales iónicos nicotínicos, o la estimulación de la sustancia P y la bradikina, que ejercen su acción sobre los receptores P2X3 y P2X2/P2X3 (Nakazawa y cols., 1994) (Nakazawa y cols., 1991) (Vial y cols., 2004b) (Ase y cols., 2005) (Paukert y cols., 2001). La activación de estos receptores modula la actividad de los P2X a través de su dominio intracelular. La interacción con otros receptores también puede tener lugar a nivel proteína-proteína, como es el caso de los receptores de serotonina, que inhiben los receptores P2X3 (Barajas-Lopez y cols., 2002), los nicotínicos $\alpha_4\beta_2$, que interaccionan con los receptores

P2X2 a través de las subunidades β_2 y cuya co-activación lleva a una inhibición recíproca de ambos receptores (Khakh y cols., 2005). De manera similar, los rho1/GABA interaccionan con el receptor P2X2 a través del extremo C-terminal de este último, y al igual que ocurre con los receptores nicotínicos y de serotonina, la activación de uno de estos receptores induce la inhibición del otro y viceversa (Boue-Grabot y cols., 2004).

En nuestro grupo de trabajo también se ha estudiado la modulación de los receptores P2X por parte de la actividad de los canales presinápticos de GABA_B en terminaciones nerviosas de cerebro medio de rata. Igualmente los receptores colinérgicos nicotínicos también modulan la actividad de los P2X en un proceso en el que se requiere la activación de la proteína CaMKII. (Gomez-Villafuertes y cols., 2004) (Gomez-Villafuertes y cols., 2003; Diaz-Hernandez y cols., 2006).

Por último, la actividad de los receptores P2X también puede verse modulada por la interacción con otras proteínas que pueden modificar la funcionalidad del receptor como se ha descrito para el P2X2 (Gendreau y cols., 2003), P2X4 (Royle y cols., 2002) y sobre todo para el P2X7, que puede interaccionar, a través de su extremo C-terminal, con varias proteínas entre las que se ha propuesto la laminina α_3 , la integrina β_2 , la tirosina-fosfatasa β (RPTP β), la α -actinina 4, la β -actina, la supervillina, 3 proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsc71), la fosfatidilinositol 4 quinasa (PI4K) y la guanilato quinasa P55 asociada a membrana (MAGuK) (Kim y cols., 2001). También se encuentra en el extremo C-terminal de este receptor una secuencia de unión a lípidos similar a la secuencia de unión a lipopolisacárido encontrada en otras proteínas. Esta región parece estar involucrada en el transporte a membrana y en la funcionalidad del receptor (Denlinger y cols., 2001).

1.4.5.- Farmacología de los receptores P2X.

Las herramientas farmacológicas disponibles a la hora de discriminar entre los diferentes receptores P2X son en muchos casos muy limitadas, e incluso existen agonistas y antagonistas que, a las mismas concentraciones, pueden actuar tanto sobre receptores P2X como P2Y.

En general pueden distinguirse dos grandes grupos en la familia de los receptores P2X. Por una parte se encuentra el grupo formado por los receptores P2X1 y P2X3, que se caracterizan por presentar una cinética de desensibilización rápida, y por ser activados por el análogo α,β -meATP, presentando también una elevada afinidad por el ATP. El otro grupo engloba al resto de receptores, P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7, que presentan una cinética de sensibilización lenta, son insensibles al α,β -meATP y presentan una EC₅₀ más elevada para el ATP. Las curvas de dosis-respuesta para los receptores P2X expresados en sistemas heterólogos muestran que la EC₅₀ para el ATP varía desde concentraciones submicromolares (EC₅₀ ~ 0,1 μ M, P2X1,3),

hasta el micromolar bajo ($EC_{50} = 10 \mu M$, P2X_{2,4,6}) (Khakh y cols., 2001) (North, 2002), siendo el P2X₇ el que presenta menor afinidad para el ATP, con una EC_{50} elevada (123 μM). Otros nucleósidos trifosfato (CTP, GTP) pueden actuar sobre diversos subtipos de receptores P2X, pero con menor potencia que el ATP, como es el caso del CTP que parece funcionar como agonista para el P2X₄ (Garcia-Guzman y cols., 1997). Lo mismo ocurre con los diadenosina polifosfato, que presentan una afinidad muy similar para todos los P2X. Otros ligandos como el ADP, AMP o los nucleótidos de uracilo son malos agonistas o resultan inactivos.

Existen también una serie de análogos de nucleótidos sintéticos que pueden activar a estos receptores, como el 2MeSATP, que es un buen agonista para todos los receptores P2X y algunos receptores P2Y, o el BzATP que es 10-30 veces más potente que el ATP para activar el receptor P2X₇ (Gonzalez y cols., 1989) (El-Sherif y cols., 2001). Es importante destacar que la afinidad de los receptores por los diferentes agonistas o antagonistas puede variar entre las distintas especies (Young y cols., 2007), como el caso del receptor P2X₇ que en humano y en rata presenta una afinidad 10 veces superior a los agonistas ATP y BzATP en comparación con el receptor P2X₇ murino. Lo mismo ocurre con antagonistas como la isoquinolina 1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina (KN-62), que inhibe el receptor P2X₇ humano ($IC_{50} = 34 \text{ nM}$) pero es inactivo en rata (Humphreys y cols., 1998).

A continuación detallaremos las características farmacológicas de los receptores P2X identificados hasta la fecha.

Receptores homoméricos.

Receptores homoméricos P2X₁.

Agonistas y antagonistas. Los receptores P2X₁ son activados por ATP y α,β -meATP (Valera y cols., 1994) y también por BzATP (Evans y cols., 1995) (Bianchi y cols., 1999). En cuanto a los antagonistas, los receptores homoméricos P2X₁ son bloqueados por suramina y PPADS (Evans y cols., 1995) aunque su efecto no es exclusivo de este receptor, pues la mayoría de las restantes subunidades P2X, así como algún receptor P2Y, también son bloqueados por estos antagonistas. En los últimos años se han desarrollado análogos de la suramina y del PPADS que parecen ser selectivos para estas subunidades, como son el NF449 o el MRS2257 (Braun y cols., 2001) (Jacobson y cols., 2002). Ambos antagonistas actúan únicamente sobre las subunidades P2X₁ y P2X₃. Los compuestos trinitrofenol-derivados, como el 2',3-O-(2',4',6')-trinitrofenil-ATP (TNP-ATP), también antagonizan el efecto del receptor P2X₁, pero no sólo de éste, al igual que la suramina y el PPADS, sino de la mayoría de las subunidades P2X. Sin embargo, son unas 1000 veces más potentes sobre los receptores homoméricos P2X₁, P2X₃ y P2X₂/P2X₃ ($IC_{50} = 0.3 - 1 \text{ nM}$) que sobre el resto de los receptores P2X, lo que puede servir para su discriminación (Thomas y cols., 1998) (Virginio y cols., 1998b). El diinosina pentafofato, Ip_5I , fue sintetizado originariamente en nuestro laboratorio y resultó ser un bloqueante muy potente del receptor

P2X1 y, en menor medida, del receptor P2X3 ($IC_{50} = 3\text{nM}$ y $3\mu\text{M}$, respectivamente) (King y cols., 1999) (Dunn y cols., 2000) (Hoyle y cols., 1997). Igualmente este receptor es sensible a la inhibición por la acción de los cationes divalentes (ver tabla 2).

Desensibilización y/o inactivación. Los receptores P2X1 sufren una rápida desensibilización cuando se produce una aplicación continuada del agonista en más de 100 - 300 ms. Además, la recuperación del canal es extremadamente lenta (North, 2002).

Receptores homoméricos P2X2:

Agonistas y antagonistas. Los receptores P2X2 son insensibles a la acción del α,β -meATP. Hasta ahora, aparte del ATP, no se conocen otros agonistas o antagonistas selectivos para este receptor. Sí está aceptado que la acción del ATP sobre él se potencia por protones y por bajas concentraciones de iones cinc y cobre (King y cols., 1997) (Wildman y cols., 1998) (Ding y Sachs, 1999). Al igual que ocurre con otros receptores P2X, es modulado negativamente, de una forma rápida, por algunos cationes divalentes como el Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Ba^{2+} (Ding y Sachs, 2000). Esta propiedad es utilizada en muchas ocasiones para diferenciar este receptor del resto de las subunidades P2X. El Brilliant Blue G (BBG), o-ATP y TNT-ATP son bloqueantes no selectivos de este receptor (Evans y cols., 1995) (Jiang y cols., 2000a).

Desensibilización y/o inactivación. La desensibilización de los receptores P2X2 es bastante lenta (la corriente no declina hasta que transcurren varias decenas de segundos en presencia del agonista). En comparación con los receptores P2X1 y P2X3, se les considera no desensibilizantes (Collo y cols., 1996) (Brake y cols., 1994).

Receptores homoméricos P2X3:

Agonistas y antagonistas. La alta afinidad del receptor P2X3 por el ATP y el α,β -meATP hacen que esta subunidad sea difícil de diferenciar del P2X1. El 2-MeSATP es un agonista igual (Lewis y cols., 1995) o incluso más potente (Garcia-Guzman y cols., 1997) que el ATP. En algunos sistemas las acciones del ATP, mediadas por el receptor P2X3, se han visto potenciadas por la presencia de cinc y Cibacron Blue (Wildman y cols., 1998) (King, 2003). De igual manera que ocurre con los agonistas, este receptor comparte la selectividad con el P2X1 por los mismos antagonistas, lo que complica aún más la diferenciación de estos dos receptores. Son antagonizados por suramina, PPADS y TNT-ATP al igual que por diinosina pentafofato, Ip_5I (King y cols., 1999) (Dunn y cols., 2000). A diferencia del receptor P2X2, no se bloquea por calcio extracelular (Virginio y cols., 1998a).

Desensibilización y/o inactivación. De la misma forma que el P2X1 sufre una rápida desensibilización en presencia del ATP, aunque las corrientes pueden mantenerse varios segundos si la concentración del agonista es muy baja ($<300\text{ nM}$). La recuperación es también muy lenta, aunque puede acelerarse si el medio contiene iones Ca^{2+} (Lewis y cols., 1995).

Receptor	EC ₅₀ (ATP)	Potencia de agonistas (EC ₅₀)	Antagonistas (IC ₅₀)	Modulación por iones	Desensibilización	Distribución mayoritaria
P2X ₁	0,1 μM	ATP=2MeSATP>Ap ₄ A≥α,β-meATP>BzATP>ADP	NF449>TNP-ATP>Ip ₅ I>MRS2257>PPADS (rango nM) Suramina>RB 2 (rango μM)	H ⁺ ↓ Zn ²⁺ ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos
P2X ₂	5 μM	ATP ≥ ATP _γ S ≥ 2MeSATP > Ap ₄ A α,β-meATP y ADP inactivos	RB 2=NF279, NF770>PPADS= TNP-ATP=BBG≥Suramina (rango μM)	H ⁺ ↑ Zn ²⁺ ↑ Cu ²⁺ ↑ Ca ²⁺ ↓	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, células cromafines, músculo liso, retina
P2X ₃	1,3 μM	2MeSATP≥ATP= α,β-meATP>Ap ₅ A>ADP	TNP-ATP>MRS2257=A317491> MRS2159=PPADS (rango nM) NF279=NF449>Ip ₅ I≥Suramina>NF023>RB 2(rango μM) A317491, NF110, rojo fenol	Zn ²⁺ ↑ H ⁺ ↓ Ca ²⁺ ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales
P2X ₄	4 μM	ATP>2MeSATP α,β-meATP y ADP inactivos Potenciación por Ivermectina, Propofol y Cibacron blue	TNP-ATP>BBG (rango μM) fenolfaleina	H ⁺ ↓ Zn ²⁺ ↑ Cd ²⁺ ↑	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon
P2X ₅	0,4 μM	ATP=2MeSATP=Ap ₄ A> α,β-meATP>BzATP ADP inactivo	PPADS>TNP-ATP>Suramina> RB 2 (rango μM)	Zn ²⁺ ↑ H ⁺ ↓ Ca ²⁺ ↓	Lenta	Ganglio del trigémino, médula espinal, células proliferativas de la piel, timo, vejiga
P2X ₆	0,6 μM	2MeSATP>ATP=α,β-meATP ADP inactivo	TNP-ATP> PPADS Insensible a Suramina	---	Lenta	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal
P2X ₇	400 μM	BzATP>2MeSATP>>ATP α,β-meATP y ADP inactivos	A-74003 ≥ A-438079 (rata, humano) BBG (rango nM) (rata) oATP (rango μM) PPADS=TNP-ATP (rango nM) KN-62 (rango nM) (humano) Suramina (rango μM) (rata, humano)	H ⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ ↓ Zn ²⁺ ↓	Lenta	Ganglios de retina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel.

Tabla 2.-Clasificación de los receptores P2X homoméricos. Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de North, 2002; King y col, 2003; 2004; Burnstock, 2007.

Receptores homoméricos P2X4:

Agonistas y antagonistas. Los receptores P2X4 comparten algunas características con el receptor P2X2, en el aspecto de que son sensibles a ATP pero no a α,β -meATP. En cambio presentan como rasgo diferencial su potenciación, mediante modulación alostérica, por la ivermectina (Krause y cols., 1998), anestésicos como el Propofol, o el Cibacron Blue (uno de los isómeros del Azul Reactivo 2) (Miller y cols., 1998). El zinc también incrementa las corrientes de este receptor, a diferencia del cobre, que no produce efecto alguno sobre éstas (Xiong y cols., 1999). En cuanto a los antagonistas, este receptor se caracteriza por ser insensible a PPADS y suramina en rata (Buell y cols., 1996) (Soto y cols., 1996b). En humano, este receptor parece ser más sensible al bloqueo por PPADS, mientras que en ratón hay indicios contradictorios sobre el efecto del PPADS, habiéndose descrito tanto la potenciación como el bloqueo del receptor por la acción de este antagonista. (Townsend-Nicholson y cols., 1999) (Jones y cols., 2000).

Desensibilización y/o inactivación. La desensibilización del receptor P2X₄ es intermedia a la observada entre las subunidades P2X1 y P2X2 (Wang y cols., 1996) (Seguela y cols., 1996) (García-Guzmán y cols., 1997).

Receptores homoméricos P2X5.

Agonistas y antagonistas. Los receptores P2X5 se caracterizan porque su activación por ATP produce corrientes de muy baja amplitud si se comparan con las observadas para las subunidades P2X1, P2X2, P2X3 y P2X4 en condiciones similares. Son bloqueados por PPADS y suramina a concentraciones similares a las del receptor P2X2 (King, 2003) (Burnstock, 2007a) (Burnstock, 2007b). Además también son modulados por el Zn, que potencia las respuestas cuando se emplea a concentraciones bajas, mientras que a concentraciones altas inhibe totalmente al receptor. Al igual que ocurre con el receptor P2X2, son modulados por el pH (Wildman y cols., 2002)

Desensibilización y/o inactivación. La desensibilización es lenta tras la activación por ATP (North, 2002) (Wildman y cols., 2002).

Receptores homoméricos P2X6.

Agonistas y antagonistas. La caracterización farmacológica de los receptores P2X6 se ha visto frenada por la dificultad que existía en expresar funcionalmente este receptor en sistemas heterólogos, como oocitos o células HEK293 (Le y cols., 1998) (Torres y cols., 1999) (North, 2002), esto hizo pensar que estas subunidades no formaban receptores funcionales. Sin embargo, recientemente se ha descrito que es posible obtener homómeros funcionales en un número limitado de células, siendo vital en su funcionalidad las glicosilaciones que sufre este receptor (Jones y cols., 2004) (Kennedy, 2005). De esta manera se ha determinado que estos receptores son sensibles tanto a ATP como a α,β -meATP, actuando ambos agonistas con igual

potencia. En cuanto a los antagonistas, los receptores P2X6 son sensibles a PPADS ($IC_{50} = 22\mu M$) y TNP-ATP ($IC_{50} = 22\mu M$) y no se ven afectados por la suramina.

Desensibilización y/o inactivación: El receptor P2X6 de rata expresado en células HEK293 sufre una lenta desensibilización tras su activación con ATP (Jones y cols., 2004) (Kennedy, 2005).

Receptores homoméricos P2X7.

Agonistas y antagonistas. El P2X7 se diferencia de los otros receptores principalmente por su extremo C-terminal extremadamente largo y por su baja afinidad por el ATP (Surprenant y cols., 1996). Este receptor también puede ser activado por BzATP, siendo éste agonista unas 10-30 veces más potente que el propio ATP (Young y cols., 2007), aunque no de forma exclusiva, ya que otros receptores P2X muestran una afinidad semejante por este agonista (Bianchi y cols., 1999). Lo que sí es característico de este receptor es la potenciación de sus respuestas cuando en el medio extracelular se reduce la presencia de cationes divalentes, como el calcio o el magnesio (Surprenant y cols., 1996) (Virginio y cols., 1997). Estas observaciones indican que, o bien es la forma ATP^{4-} el ligando activo de esta subunidad, o que los cationes divalentes son capaces de inhibir dicho receptor alostéricamente (Virginio y cols., 1997). Esto se refuerza con la sensibilidad que muestra el P2X7 a la inhibición por calcio, magnesio, cinc, cobre y protones. El ATP oxidado (o-ATP) es un antagonista irreversible, empleado a concentraciones entre, 0,1 - 0,3 mM, (Murgia y cols., 1993) (Di Virgilio, 2003) pero no es selectivo, pues a dichas concentraciones también es capaz de bloquear otras subunidades como P2X1 y P2X2, aunque de manera parcial y reversible (Evans y cols., 1995). El antagonista más potente y que mejor permite diferenciar el receptor P2X7 es el BBG ($IC_{50} \sim 10-15nM$), sobre todo en rata, mientras que en humano su efectividad es mucho menor ($IC_{50} \geq 10\mu M$), siendo la IC_{50} de 100nM en el caso del ratón (Jiang y cols., 2000a) (Young y cols., 2007). Recientemente han aparecido dos nuevos antagonistas selectivos para esta subunidad, A-740003 y A-438070, de los laboratorios Abbot, cuyo funcionamiento se ha descrito, tanto en rata como en humano, en el rango nanomolar alto (Honore y cols., 2006) (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007). El P2X7 es igualmente sensible a PPADS y suramina (North, 2002), aunque en roedores, este último no tiene efecto alguno hasta concentraciones del orden de 300 μM . Otros bloqueantes, como el KN-62 (conocido como inhibidor de la calcio/calmodulina proteína quinasa tipo II, CaMKII), ejercen su efecto en función de la especie, bloqueando el receptor P2X7 humano, pero no el de rata (Humphreys y cols., 1998).

Desensibilización y/o inactivación. El P2X7 es el receptor que menos se desensibiliza y sus corrientes se mantienen en presencia de ATP y BzATP durante aplicaciones prolongadas. Además, las aplicaciones de larga duración a veces van acompañadas de incrementos en la amplitud de la corriente (North, 2002) (Virginio y cols., 1999) (Surprenant y cols., 1996).

Receptores P2X heteroméricos.

Hasta la fecha se han descrito 8 heterooligómeros para los receptores P2X. Estos heterooligómeros modifican la función, farmacología y expresión de los receptores, incrementando la diversidad de la familia de receptores P2X. Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en sistemas de sobreexpresión de receptores en oocitos de *Xenopus* o en líneas celulares de mamíferos. Esto hace que en muchos casos, no se conozca si los heterómeros se expresan realmente en condiciones fisiológicas. Por ello describiremos las características de estos receptores siguiendo las agrupaciones realizadas por Murrell-Lagnado y Qureshi (2008), en función de la naturaleza de las pruebas obtenidas para cada receptor.

Grupo 1:

En este grupo se muestra al único receptor heteromérico P2X del que se han obtenido pruebas claras de su relevancia fisiológica.

Receptor P2X2/P2X3.

Este receptor muestra características farmacológicas intermedias de ambas subunidades, siendo activado por α,β -meATP, como el P2X3, pero mostrando una cinética de desensibilización lenta, como el P2X2. El receptor P2X3 es el de distribución más restrictiva de toda la familia, pero se ha encontrado coexpresado con el P2X2 en neuronas sensoriales (Kobayashi y cols., 2005). Igualmente se han identificado corrientes características de este receptor en neuronas de los ganglios cervicales superiores, del dorsal de la médula espinal, nudosos o celiacos, y se han coimmunoprecipitado estas subunidades en sistemas heterólogos. Otros estudios han encontrado que la expresión de las subunidades P2X3 es capaz de rescatar a los mutantes P2X2 no funcionales y con transporte alterado (Wilkinson y cols., 2006) (Chaumont y cols., 2004), y también se ha demostrado que estos trímeros se ensamblan a razón de dos subunidades de P2X3 por una de P2X2 (Jiang y cols., 2003a).

Grupo 2.

En este grupo se incluyen los heterómeros de los que se ha demostrado que pueden coensamblar y formar un receptor funcional pero que únicamente han sido descritos en sistemas de sobreexpresión heteróloga.

Receptor P2X2/P2X6.

Los receptores P2X2, P2X4 y P2X6 se encuentran coexpresados en varias regiones del sistema nervioso central, sobre todo en las espinas dendríticas cerca de las zonas de especialización postsináptica (Rubio y Soto, 2001). La colocalización observada en sistemas nativos, así como la coimmunoprecipitación en sistemas heterólogos sugiere que estos receptores pueden coensamblar (Torres y cols., 1999). Las respuestas de los receptores P2X2/P2X6 son

difíciles de distinguir de las del P2X2 homomérico aunque la presencia de la subunidad P2X6 incrementa la permeabilidad del receptor P2X2 al calcio en un 50% (Le y cols., 1998) (King y cols., 2000). A diferencia del receptor P2X2/P2X3, los estudios llevados a cabo con microscopia de fuerza atómica (AFM), han revelado que los heterómeros pueden estar formados por 2 subunidades de P2X2 y una de P2X6, o a la inversa en función de los niveles de expresión de las subunidades (Barrera y cols., 2007).

Receptor P2X1/P2X2.

Su estudio se ha basado en sistemas de sobreexpresión en oocitos de *Xenopus*. Muestran en estos sistemas una preferencia a la heteromerización frente a la homomerización al igual que una sensibilidad al pH diferente (Brown y cols., 2002) (Aschrafi y cols., 2004). También se ha descrito la presencia de un receptor P2X1/P2X2 en neuronas del ganglio cervical (Calvert y Evans, 2004).

Receptor P2X1/P2X4.

La subunidad P2X4 es la más ampliamente expresada a lo largo de múltiples tejidos y solapa con el P2X1 en músculo liso, microglia y células del sistema inmune (Xiang y Burnstock, 2005b). Los últimos estudios en *Xenopus* muestran una heteromerización de ambas subunidades, siendo el receptor P2X1/P2X4 más sensible a α,β -meATP que el P2X4 y con una desensibilización más lenta que el P2X1 (Nicke y cols., 2005).

Grupo 3.

En este grupo se incluyen aquellas subunidades para las que se ha demostrado coinmunoprecipitación y evidencias funcionales de interacción pero no se ha demostrado directamente la existencia de heterotrímeros.

Receptor P2X1/P2X5.

Ambas subunidades se coexpresan en el asta ventral de la médula espinal y coinmunoprecipitan al ser coexpresadas en células HEK 293 (Torres y cols., 1998) (Collo y cols., 1996). Funcionalmente muestra una desensibilización bifásica frente al α,β -meATP (siendo el P2X5 insensible a este agonista), mientras que se resensibiliza de forma mucho más rápida que el P2X1 (Torres y cols., 1998) (Le y cols., 1999). Igualmente, se ha descrito la presencia de un receptor P2X1/P2X5 en corteza de ratón (Lalo y cols., 2008)

Receptor P2X4/P2X5.

No hay evidencias funcionales de este heterómero, aunque ambas subunidades coinmunoprecipitan cuando se coexpresan en células HEK293 (Torres y cols., 1999). En este modelo celular el tráfico de la subunidad P2X5 a la membrana se ve alterado por interacción

con las subunidades P2X4 (Murrell-lagnado, resultados sin publicar).

Receptor P2X4/P2X6.

Como hemos dicho anteriormente, ambos receptores están coexpresados en el sistema nervioso central. En los sistemas heterólogos coinmunoprecipitan y su coexpresión varía la distribución del receptor P2X6 (Torres y cols., 1999). Este receptor muestra una sensibilidad mayor a antagonistas como la suramina o el azul reactivo 2 (Le y cols., 1998).

Receptor P2X4/P2X7.

El receptor P2X4 se coexpresa junto con el P2X7 en células del sistema inmune, y células endoteliales y epiteliales (Murrell-Lagnado y Qureshi, 2008), así como en cerebelo (Hervas y cols., 2003) (Marin-Garcia, 2007). Ambos coinmunoprecipitan cuando son expresados en sistemas heterólogos, al igual que los receptores endógenos en los macrófagos derivados de médula ósea de ratón, donde demostraron características farmacológicas mixtas y diferentes de las subunidades nativas (Guo y cols., 2007). Igualmente se han identificado corrientes de un receptor nativo semejante al P2X4/P2X7 en células epiteliales de las vías respiratorias (Ma y cols., 2006). Sin embargo, alguno de estos estudios indican que cuando ambas subunidades se coexpresan en sistemas heterólogos o en su distribución endógena, la forma predominante para ambos receptores es la de homotrímeros (Nicke, 2008).

1.4.6.-Distribución tisular y funciones fisiológicas de los receptores P2X.

Los receptores P2X están ampliamente distribuidos a lo largo de todo el organismo, coexpresándose en multitud de tejidos. Son muy abundantes en tejidos excitables, como el músculo liso o el tejido nervioso, aunque están también expresados en células del sistema inmune, plaquetas, endotelio vascular, epitelio respiratorio, y tejidos endocrinos (Ralevic y Burnstock, 1998) (Surprenant A, 2008). En el sistema nervioso están expresados tanto en neuronas como en glía (North, 2002) (Rubio y Soto, 2001).

El receptor P2X1 fue el primero en clonarse y se expresa abundantemente en músculo liso vascular y corazón (Vial y Evans, 2002) (Hansen y cols., 1999). La activación de este receptor en plaquetas genera corrientes de entrada de calcio asociadas a cambios en la forma de estas células (Rolf y cols., 2001) y podría participar en la formación de trombos bajo determinadas condiciones de estrés (Gachet, 2008). El P2X1 participa también en la autoregulación renal, ayudando al mantenimiento de un flujo sanguíneo y de una filtración glomerular adecuadas, proceso en el que también están implicados los receptores A1 de adenosina (Surprenant A, 2008). Los estudios realizados con ratones deficientes de P2X1 han puesto de manifiesto que estos animales son estériles, debido a la implicación de este receptor en la contracción del vaso deferente (Mulryan y cols., 2000).

En cuanto al sistema nervioso son varios los estudios en los que se ha detectado la presencia de este receptor, en neuronas, como las granulares de cerebelo de rata (Hervas y cols., 2003) y ratón (Marin-Garcia, 2007). Estudios realizados en terminaciones presinápticas, han involucrado a este receptor como responsable, junto a otros P2X, de la modulación de la liberación de glutamato (Shigetomi y Kato, 2004). Este receptor aparece no sólo como homómero en sistema nervioso sino que también se han descrito la presencia de un receptor P2X1/P2X5 en corteza de ratón (Lalo y cols., 2008) y de un receptor P2X1/P2X2 en neuronas del ganglio cervical (Calvert y Evans, 2004).

El P2X2 participa por su parte en numerosas funciones dentro del sistema nervioso. Está asociado a la modulación de la liberación presináptica de glutamato en hipocampo (Khakh y cols., 2003), y junto con el receptor P2X4, está involucrado en la despolarización y liberación hormonal en la pituitaria (Zemkova y cols., 2007). Otra de las funciones de este receptor es la regulación de la respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo (Rong y cols., 2003), y la modulación del potencial endococlear (Housley y cols., 2002) (Munoz y cols., 1999) (Lee y cols., 2001).

El P2X2 se encuentra expresado junto con el receptor P2X3 en varios tejidos y ambos están asociados a la regulación de varias funciones. Al igual que el heterómero P2X2/P2X3, están involucrados de forma directa en la transducción de la señal del gusto (Yoshida y cols., 2006) (Roper, 2007). Igualmente el ATP puede actuar como transmisor de las vías aferentes auditivas a través de la activación de receptores P2X2 y P2X3 (Housley y cols., 2002) (Munoz y cols., 1999) (Lee y cols., 2001). Ambos receptores participan también en la regulación de la motilidad intestinal (Ren y cols., 2003) (Bian y cols., 2003), y el heterómero P2X2/P2X3 participaría además en la excitación de las vías aferentes causadas por hipoxia, lo que ha sido comprobado con el uso de ratones KO para la subunidad P2X2 (Rong y cols., 2003) (Spyer y cols., 2004). El receptor P2X3 está asimismo ampliamente expresado en las neuronas aferentes implicadas en la sensación del dolor, participando de manera activa en la recepción del dolor neuropático e inflamatorio (Wirkner y cols., 2007a). Por otro lado, la distensión de la vejiga urinaria produce la liberación de ATP que activa el receptor P2X3 situado en las vías aferentes presentes en la vejiga (Yu y de Groat, 2008) (Ferguson y cols., 1997) (Cockayne y cols., 2000).

Las respuestas de calcio obtenidas al estimular con ATP las neuronas de Purkinje de cerebelo de rata neonatal estarían mediadas por un receptor compuesto por las subunidades P2X2 formando un heterómero P2X2/P2X6 (Mateo y cols., 1998) (Garcia-Lecea y cols., 1999). Este receptor cambia la composición de subunidades con el desarrollo, de modo que en el adulto se encuentra presente un heterómero P2X4/P2X6 (García-Lecea, 2000). La presencia del receptor P2X3 también ha sido descrita en terminaciones sinápticas de cerebro medio (Díaz-Hernandez y cols., 2001) y en neuronas granulares de cerebelo de rata y ratón (Hervas y cols., 2003) (Marin-Garcia, 2007).

El receptor P2X4 está implicado en sistema nervioso en la potenciación a largo plazo en el hipocampo, como se desprende de los estudios realizados en ratones KO para P2X4 (Sim y cols., 2006). Igualmente está implicado en la transmisión del dolor neuropático, incrementándose su expresión en la microglia del asta dorsal de la médula espinal en modelos de alodinia inducida (Tsuda y cols., 2003). También participa en los incrementos de flujo de calcio y en la producción de óxido nítrico en el endotelio vascular, al igual que en la vasodilatación producida por el ATP (Yamamoto y cols., 2006). Este receptor también está abundantemente expresado, junto con los receptores P2X1 y P2X7 en las células del sistema inmune (Burnstock y Knight, 2004), y colocaliza con el receptor P2X6 en las sinapsis de las neuronas piramidales hipocámpales y las Purkinje en cerebelo (Surprenant A, 2008).

Las subunidades P2X5 y P2X6 encuentran normalmente formando parte de canales heteroméricos, aunque también forman receptores homómeros (North, 2002). Las subunidades P2X5 son abundantes en el núcleo mesencefálico del trigémino y algo menos en la médula espinal (Collo y cols., 1996). Igualmente trabajos recientes han detectado marcaje para el receptor P2X5 en numerosas zonas del Sistema Nervioso Central de ratón, como las células mitrales del bulbo olfativo, corteza y neuronas de Purkinje de cerebelo, varias zonas de corteza, tálamo, hipotálamo y cerebro medio (Guo y cols., 2008). Este receptor también se encuentra ampliamente expresado en el hipotálamo de rata, especialmente en las regiones paraventriculares y en el núcleo supraóptico (Xiang y cols., 2006a). El receptor P2X5 se expresa, junto con los receptores P2X2 y P2X3 en el sistema nervioso entérico, siendo particularmente abundante su presencia en los plexos submucoso y mientérico (Ruan y Burnstock, 2005), mientras que el receptor P2X6 es muy abundante en músculo esquelético y también ha sido detectado en cerebro de rata (Urano y cols., 1997) (Nawa y cols., 1998) (Soto y cols., 1996a).

El receptor P2X7 está expresado en una gran variedad de tejidos y asociado a múltiples funciones. El receptor P2X7 está involucrado en la transmisión del dolor, como demuestran los trabajos en los que se redujeron los niveles de dolor neuropático e inflamatorio en ratón y rata, tras la inhibición del receptor (Chessell y cols., 2005) (Honore y cols., 2006). Varios estudios sugieren también la participación del P2X7 en las secreciones salivares (Alzola y cols., 1998) (Pochet y cols., 2007). Asimismo también está relacionado con la fibrosis renal, que se produce como consecuencia de la acumulación anormal de sustancias de la matriz extracelular, producidas principalmente por las secreciones de TGF β (factor de crecimiento transformante β) por parte de las células mesangiales. Los estudios llevados a cabo en roedores indican que el receptor P2X7 produce un incremento de la apoptosis en las células mesangiales renales, incrementando los niveles de TGF β y la acumulación de fibronectina (Schulze-Lohoff y cols., 1998) (Harada y cols., 2000) (Solini y cols., 2005). Estos efectos se redujeron drásticamente en los ratones KO para P2X7 (Goncalves y cols., 2006). Sin embargo, los mismos estudios llevados a cabo en tejido humano revelaron que, en este caso, estos efectos estaban mediados por un receptor de adenosina A3 (Wen y Knowles, 2003). El receptor P2X7 colabora con el receptor

P2X4 en el endotelio vascular, y se postula la participación de un heterómero P2X4/P2X7 en la potenciación, inducida por ATP, de los movimientos ciliares que contribuyen a la aclaración de las secreciones mucosas en las células epiteliales ciliadas del sistema respiratorio (Ma y cols., 1999) (Ma y cols., 2006). El receptor P2X7 fue inicialmente clonado en macrófagos (Buisman y cols., 1988) (Di Virgilio, 1995) y se expresa junto con los receptores P2X1 y P2X4 en una gran variedad de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos B y T, monocitos, macrófagos, microglía y también en osteoclastos (Burnstock y Knight, 2004). Este receptor participa en el proceso inflamatorio por medio de la liberación de IL-1 β en macrófagos y microglía activada, lo que puede causar la apoptosis en las células circundantes (Ferrari y cols., 2006) (Brough y cols., 2003) (Di Virgilio, 2007). El P2X7 estimula la muerte de patógenos intracelulares presentes en los macrófagos a través de la apoptosis que causa su activación en las células, produciéndose la formación de vacuolas intracelulares o lisosomas que se fusionan con los fagosomas que contienen las micobacterias (Placido y cols., 2006) (Saunders y cols., 2003). Algunos estudios implican al receptor P2X7 en la formación de células gigantes multinucleadas y osteoclastos con acción patológica, derivados de la fusión de células de la línea de fagocitos mononucleados, en enfermedades granulomatosas (Steinberg y Hiken, 2007). Aunque estos datos no están del todo claros, los estudios llevados a cabo con ratones KO para P2X7 o con antagonistas del receptor, dejan claro que participa activamente en la regulación de los osteoclastos en hueso, en la formación y reabsorción del hueso, además de la estimulación mecánica del esqueleto (Ke y cols., 2003) (Garland y cols., 2003) (Grol y cols., 2009).

Durante mucho tiempo ha existido controversia en lo que se refiere a la presencia del receptor P2X7 en el sistema nervioso (Anderson y Nedergaard, 2006), sin embargo hoy en día, cada vez son más los trabajos que ponen de manifiesto, sin lugar a dudas, la expresión funcional de estos receptores en neuronas, (Alloisio y cols., 2008) (Deuchars y cols., 2001) (Armstrong y cols., 2002) (Lundy y cols., 2002; Miras-Portugal y cols., 2003) (Hervas y cols., 2003, 2005) (Deng y Fyffe, 2004) (Leon y cols., 2006; Marin-Garcia, 2007; Marin-Garcia y cols., 2008) (Sanchez-Nogueiro y cols., 2005) participando en numerosas e importantes funciones como la modulación de la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el GABA (Sperlagh y cols., 2002) (Atkinson y cols., 2002) (Atkinson y cols., 2004) (Leon y cols., 2008) . La inhibición de estos receptores está asociada al crecimiento y ramificación axonal en las neuronas hipocampales (Diaz-Hernandez y cols., 2008), así como a la recuperación terapéutica de numerosas situaciones patológicas (Sperlagh y cols., 2006) como el daño en la espina dorsal (Wang y cols., 2004), la inflamación y el dolor neuropático (Chessell y cols., 2005), las lesiones en retina (Franke y cols., 2005), la enfermedad de Huntington (Diaz-Hernandez y cols., 2009) o de Alzheimer (Parvathenani y cols., 2003) . En otros sistemas, como en las neuronas granulares es la activación de este receptor la que está asociada a la supervivencia neuronal frente a determinados estímulos proapoptóticos (Ortega, 2009).

1.5.- Receptores P2Y.

Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G pertenecientes a la familia de los receptores de rodopsina clase A, concretamente al grupo δ , que también incluye a los receptores de unión a glicoproteínas, los PARs y los receptores olfativos (Lagerstrom y Schioth, 2008). Su señalización está acoplada a proteínas de membrana, como PLC, adenilato ciclasa, o a canales iónicos a través de la interacción con subunidades específicas de las proteínas G (Abbracchio y cols., 2003) (Ralevic y Burnstock, 1998). Los primeros miembros de esta familia en ser clonados fueron el P2Y₁, en cerebro de pollo, y el P2Y₂, en oocitos de *Xenopus* en 1993 (Webb y cols., 1993) (Lustig y cols., 1993). Actualmente la familia consta de ocho subtipos clonados y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos: P2Y₁ (Tokuyama y cols., 1995; Ayyanathan y cols., 1996; Schachter y cols., 1996), P2Y₂ (Lustig y cols., 1993; Parr y cols., 1994), P2Y₄ (Communi y cols., 1995) (Nguyen y cols., 1995), P2Y₆ (Chang y cols., 1995) (Communi y cols., 1996a), P2Y₁₁ (Communi y cols., 1997), P2Y₁₂ (Hollt y cols., 2001), P2Y₁₃ (Communi y cols., 2001) (Marteau y cols., 2003) y P2Y₁₄ (Chambers y cols., 2000) (Abbracchio y cols., 2003). Los saltos en la numeración de estos receptores se corresponden con aquellos identificados inicialmente como receptores P2Y y descartados posteriormente al descubrir sus ligandos principales, como el receptor de leucotrieno LTB₄, inicialmente denominado P2Y₇ (Yokomizo y cols., 1997), el P2Y₉, que, en realidad, es un receptor de ácido lisofosfatídico 4, LPA4 (Noguchi y cols., 2003), o el P2Y₁₅, receptor de α -cetoglutarato oxoglutarato 1 (Inbe y cols., 2004). Otras veces, estos saltos de numeración corresponden a receptores clonados en vertebrados no mamíferos cuyos ortólogos mamíferos aún no han sido identificados, como es el caso del p2y3 y p2y8 obtenidos de cerebro de pollo y de *Xenopus laevis*, respectivamente (Webb y cols., 1996) (Bogdanov y cols., 1997). Los receptores P2Y se expresan a lo largo de todo el organismo, mediando por sí mismos o modulando multitud de funciones, aunque a día de hoy solamente unos pocos efectos fisiológicos mediados por estos receptores han sido confirmados fuera de toda duda (Fischer y Krugel, 2007).

Además de los receptores identificados hasta la fecha, pueden existir otros P2Y no identificados aún (von Kugelgen, 2006), de hecho se han identificado varios receptores huérfanos asociados a los P2Y. Entre ellos, el GPR17, que se describió primero como un receptor de cisteil-leucotrienos y posteriormente se observó que también respondía a UDP (Inbe y cols., 2004) (Ciana y cols., 2006). Este receptor, muy abundante en telencéfalo, tanto en neuronas como en precursores de oligodendrocitos, actúa como un sensor de daño cerebral, jugando un papel muy importante tanto en la muerte neuronal por daño isquémico como en la modulación de la respuesta de reparación, remodelación y remielinización (Lecca y cols., 2008). Otros receptores huérfanos asociados a los P2Y, ya que tienen las secuencias estructurales de los segmentos transmembrana TM6 y TM7 en común con ellos, son los GPR34, H963 y GPR87 (Schoneberg y cols., 1999) (Joost y Methner, 2002) (Vassilatis y cols., 2003), aunque este último ha sido

identificado en realidad como un receptor de ácido lisofosfatídico cuya estructura indica que podía haber evolucionado a partir de un antecesor P2Y común (Tabata y cols., 2007).

La clasificación farmacológica de los P2Y se hace en función de la afinidad que los distintos subtipos muestran frente a los nucleótidos de adenina y uridina. Estas respuestas varían en potencia dependiendo de las especies. En función de esto, los receptores se dividen en tres grupos. El primero está formado por los receptores P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₁, que son activados únicamente por nucleótidos de adenina (ATP/ADP). En el segundo grupo se encuentran el P2Y₂ humano y el P2Y₄ en roedores, que responden tanto a nucleótidos de adenina como de uracilo, y el P2Y₄ humano, P2Y₆, y P2Y₁₄ que responden preferentemente a nucleótidos de uracilo UTP/UDP y, en el caso del P2Y₁₄ a UDP-glucosa (Burnstock, 2004) (Abbracchio y cols., 2003) (Sak y Webb, 2002). Los receptores de los que se conocen un mayor número de funciones asociadas, el P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁ están acoplados predominantemente a PLC (vía G_q/G₁₁) y a la movilización de los reservorios intracelulares de calcio. El P2Y₁₁, además, es el único que está acoplado a la activación de la adenilato ciclasa vía G_s. Los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, por su parte, tienen en común su acoplamiento a la inhibición de la adenilato ciclasa vía G_i/G_o (von Kugelgen y Wetter, 2000) (Abbracchio y cols., 2003) (Ralevic y Burnstock, 1998).

1.5.1.- Estructura de los P2Y.

En general, los receptores P2Y responden a la estructura de un receptor acoplado a proteínas G, con 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular. Estos receptores ya se encuentran funcionales en pasos muy tempranos de la evolución, como por ejemplo en la raya *Raja erinacea*, sugiriendo que los receptores de nucleótidos están entre los más antiguos receptores extracelulares expresados en el reino animal (Dranoff y cols., 2000).

Los receptores P2Y poseen una estructura que va desde los 328 aminoácidos del P2Y₆ hasta los 377 del P2Y₂, con una masa molecular de entre 41 y 53 kDa, compartiendo entre ellos entre un 20 y un 50% de homología (Shaver, 2001), en el caso de los P2Y humanos. Estructuralmente, los P2Y se pueden clasificar en receptores acoplados a proteínas G_q (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁) y acoplados a proteínas G_i (P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄) (von Kugelgen, 2006). Estos receptores poseen secuencias altamente conservadas en los dominios transmembrana 3, 6 y 7 que intervendrían de forma crítica en la unión del ligando. Esta unión sucedería de forma secuencial en varias etapas. Inicialmente el ligando se une en una conformación energéticamente favorable formada por los lazos extracelulares y los segmentos transmembrana más alejados que forman los dos MBS (sitios de meta-unión). El ligando pasa primero por el MBS-I, donde los residuos Thr47, Glu209 y Arg287 (tomando como modelo para estos estudios el receptor

P2Y₁ humano) se ocupan de la unión de la adenina, la ribosa y los fosfatos, respectivamente. De ahí el ligando pasa al MBS-II donde intervienen los residuos Arg128, Asp204, Ser213, Thr222, Lys280 y Gln307, y finalmente pasan al sitio de unión principal donde los residuos Gln307 y Ser314 se encargan de la unión de la adenina, y los residuos Arg12, Thr222, Lys280 y Arg310 se ligan los grupos fosfato. La intervención de estos residuos permite rebajar la energía necesaria para la formación del complejo ligando-receptor (Moro y Jacobson, 2002) (Costanzi y cols., 2004) (Ivanov y cols., 2006) (Jacobson y cols., 2004). En receptores como el P2Y₁₂, se ha demostrado la importancia de alguno de estos residuos en el funcionamiento y unión de

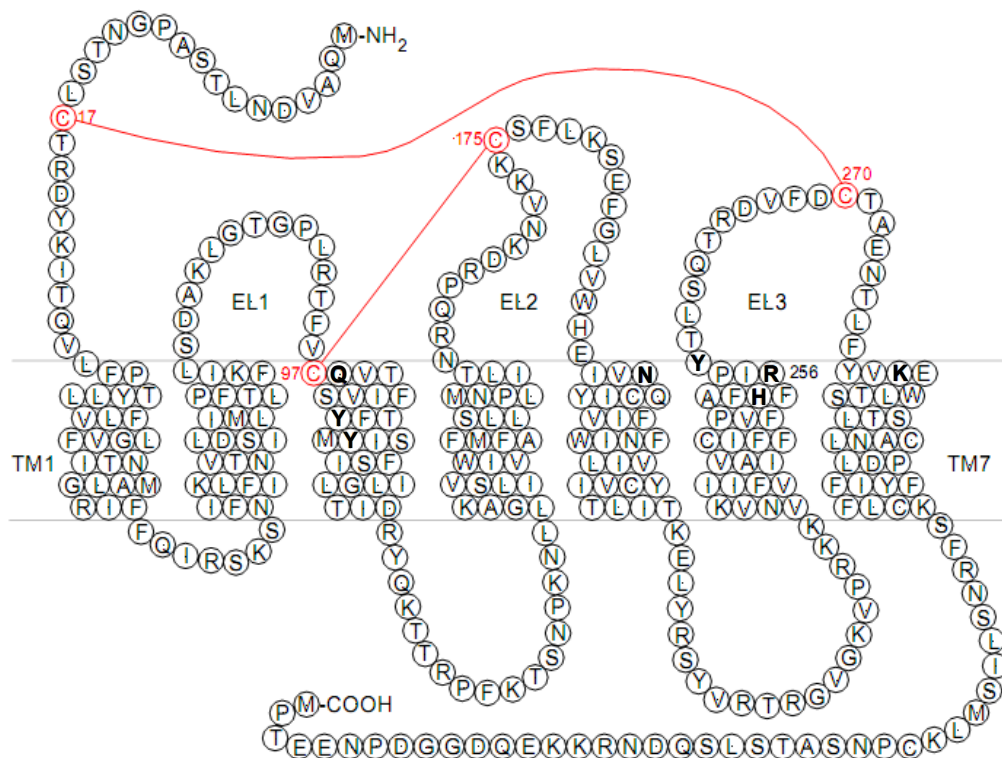


Figura 6.- Estructura secundaria propuesta para el receptor P2Y₁₂. Los residuos implicados en la unión del ligando aparecen en negrita, mientras que los de color rojo indican la formación de puentes disulfuro. EL dominio extracelular y TM segmentos transmembrana. Imagen tomada de Von Kugelgen, 2006.

agonistas y antagonistas al receptor, como los residuos Lys280 (TM7), Tyr259, H253 y Arg256 del TM6, que tendrían un papel clave en el reconocimiento del agonista y del antagonista RB2 (Hoffmann y cols., 2008).

Todos los P2Y poseen cuatro residuos de cisteína en los lazos extracelulares y en el extremo N-terminal, que pueden formar uno o dos puentes disulfuro, y que están implicados en numerosas funciones. Por ejemplo, el puente formado entre el segmento transmembrana 3 y el lazo extracelular 2 se requiere para el correcto tráfico a la membrana del P2Y₁ humano (Hoffmann y cols., 1999), mientras que el P2Y₁₂ muestra un único puente disulfuro y dos cisteínas libres que pueden actuar como dianas para antitirobóticos que inactivan el receptor

(Ding y cols., 2003). En los lazos extracelulares del P2Y₂ se encuentra también una secuencia de interacción con integrinas que es necesaria para el mantenimiento del receptor en un estado de alta afinidad (Weisman y cols., 2005).

Los receptores P2Y presentan un mayor grado de variabilidad en el extremo C-terminal y los lazos intracelulares, que regulan la interacción con las proteínas G. Cada receptor está asociado a una o varias proteínas G. Además de esto, algunos P2Y como el P2Y₂ o el P2Y₄ poseen en su extremo C-terminal y en el tercer bucle extracelular secuencias de serina/treonina que pueden ser dianas para quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G y para la PKC. Estas secuencias estarían implicadas en la desensibilización o internalización del receptor promovida por la presencia continuada del agonista (Otero y cols., 2000) (Brinson y Harden, 2001) (Flores y cols., 2005). Igualmente, aparecen dominios ricos en prolina de homología SH3 que intervienen en la transactivación de las vías de señalización activadas por los factores de crecimiento (Weisman y cols., 2005).

Constitutivamente o bajo determinadas situaciones los receptores P2Y pueden formar homo o heterodímeros, quizás para dotar de mayor estabilidad a su estructura. Un ejemplo es la homodimerización del P2Y₁ o del P2Y₆ como consecuencia de la exposición continuada al agonista, probablemente de forma previa a su internalización y renovación (D'Ambrosi y cols., 2007) (Marchese y cols., 1999) (Choi y cols., 2008). También se han descrito homo-oligómeros para el P2Y₄ en varias neuronas del sistema nervioso central y periférico (D'Ambrosi y cols., 2006), y tanto este receptor como el P2Y₆ muestran dominios apropiados para la interacción con otros receptores como los P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁. (D'Ambrosi y cols., 2007). Igualmente, en células HEK293 y 1321N1 de astrocitoma, se ha comprobado por FRET y por coimmunoprecipitación la heterooligomerización del receptor P2Y₁ y P2Y₁₁, que estaría regulando la internalización del propio receptor P2Y₁₁ (Ecke y cols., 2008b). Además de los oligómeros entre receptores P2Y, estos pueden interaccionar con otros receptores, como se ha descrito para el P2Y₁ y el receptor A1 de adenosina, que presenta un perfil farmacológico mixto, respondiendo a nucleótidos difosfato de adenina, y siendo sensible a antagonistas del receptor A1, como el DPCPX (Yoshioka y Nakata, 2004) (Yoshioka y cols., 2002). Este mismo tipo de interacción entre ambos receptores resulta en la modulación de su respuesta a nivel de las proteínas G en células astrogiales (Tonazzini y cols., 2008) (Sichardt y Nieber, 2007).

1.5.2.- Vías de señalización activadas por P2Y.

Como hemos citado anteriormente, los receptores P2Y median sus vías de señalización principales por medio de diferentes familias de proteínas G. La mayoría de ellos (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁) se asocian principalmente a la Gα_{q/11}, que activa la PLC-β, generando diacilglicerol e IP₃, y movilizandolos los reservorios de calcio intracelulares (Volonte y cols., 2006). Además, pueden estar acoplados a la adenilato ciclasa, siendo el P2Y₁₁, el único que puede asociarse con la Gα_s, activando la adenilato ciclasa e incrementando los niveles intracelulares de AMP cíclico (Communi y cols., 1997) (Torres y cols., 2002). Otros receptores de este grupo pueden asociarse con otras proteínas G, como el P2Y₂, que puede asociarse con Gα_{i/o} (Janssens y cols., 1999), aunque este acoplamiento es más característico de la subfamilia formada por los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ que se asocian principalmente a proteínas Gα_{i/o}, inhibiendo la adenilato ciclasa y la formación del AMPc (Hollopeter y cols., 2001) (Communi y cols., 2001) (Chambers y cols., 2000). De la misma forma que en el subgrupo anterior, se hayan diversos estudios en líneas celulares que indican que ciertos P2Y pueden acoplarse a distintas familias de proteínas G en función del agonista que los estimule, por ejemplo, el P2Y₁₃ puede unirse simultáneamente a Gα_i/ Gα_s o a Gα₁₆ (Marteau y cols., 2003). De la misma forma, según los agonistas implicados en la estimulación, se activan unas vías de señalización u otras, como sucede en el caso del P2Y₁₁, que cuando se activa por ATP puede incrementar los niveles de IP₃ y de calcio vía Gα_q y los niveles de AMPc vía Gα_s, mientras que cuando es estimulado por UTP, induce un incremento en los niveles de calcio intracelulares sin que se produzcan alteraciones en los niveles de AMPc o IP₃ (White y cols., 2003).

Como ocurre con la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G, la activación de los P2Y está también frecuentemente asociada a la activación de las MAP quinasas (MAPK), especialmente de las ERK1/2. Esta activación se produce por medio de diferentes vías de señalización, según el receptor implicado y el tipo celular (Abbracchio y cols., 2006) (Neary y cols., 2006) (Erb y cols., 2006). Por ejemplo, el P2Y₂ activa las ERK vía Gα_q/PLC-β/PKC/Ras/Raf/MEK. Mientras que el P2Y₁₂ puede activar distintas respuestas, como proliferación mediada por las ERK vía Gα_i/RhoA/PKC, diferenciación vía Gβγ/Src/Pyk2/Rap1/Akt, o agregación en las plaquetas vía Gβγ/PI3K/Akt y también por medio de Gα_{12/13}/RhoA/Rho quinasa (Van Kolen y cols., 2006) (Moers y cols., 2003) (Van Kolen y Slegers, 2006).

En la presente Tesis, se demuestra también el acoplamiento de la señalización del receptor P2Y₁₃ a la fosforilación en serina e inhibición catalítica de la GSK3, vía Gβγ/PI3K/Akt, resultando en la estabilización y translocación al interior del núcleo del regulador transcripcional y sustrato de la proteína GSK3, β-catenina (Ortega y cols., 2008). Recientemente, también se ha descrito la regulación de la endocitosis de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en hepatocitos,

Introducción

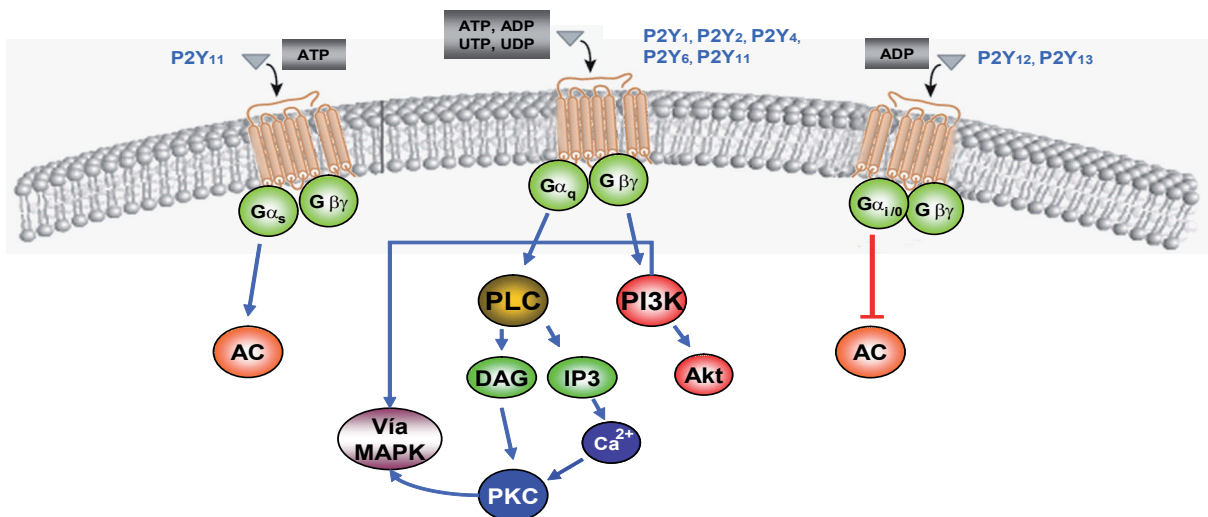


Figura 7 Representación esquemática de las principales vías de señalización activadas por los receptores P2Y. La mayoría de los receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁) se asocian principalmente a la G $\alpha_{q/11}$, que activa la PLC- β , generando diacilglicerol e IP₃, y movilizando los reservorios de calcio intracelulares y la activación de vías de señalización dependientes de PKC. Igualmente los receptores P2Y pueden activar a la PI3K a través de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G. Los receptores P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ están acoplados a la adenilato ciclasa, regulando su actividad. Los receptores P2Y₁₂ y P2Y₁₃ la inhiben vía G $\alpha_{i/o}$ mientras que el receptor P2Y₁₁ la activa vía G α_s .

por parte de este receptor a través de una vía dependiente de RhoA/ROCK I (Malaval y cols., 2009).

Además de todas estas vías de señalización, en el sistema nervioso los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como canales dependientes de voltaje de Ca²⁺ o K⁺, los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vanilloides (Abbracchio y cols., 2006) (Lechner y Boehm, 2004). A través de su acoplamiento a proteínas G $\alpha_{i/o}$ y de la liberación las subunidades G $\beta\gamma$, los receptores P2Y pueden inhibir los canales de Ca²⁺ tipo N y activar los canales GIRK de K⁺, como se ha descrito para el receptor P2Y₁₂ en neuronas simpáticas, o el P2Y₁₃ en células HEK293 (Simon y cols., 2002) (Filippov y cols., 2004) (Wirkner y cols., 2004). Por otra parte, los receptores P2Y acoplados a proteínas G $\alpha_{q/11}$ a través de una vía G α_q o bien por PLC, inhiben ambos tipos de canales, además de los tipo M de K⁺ (Filippov y cols., 2003) (Filippov y cols., 2000) (Brown y cols., 2000). La modulación de los canales de Ca²⁺ tipo N tiene como resultado la modulación de la transmisión sináptica a través de la inhibición de la liberación de neurotransmisores (Lechner y Boehm, 2004) (Fischer y Krugel, 2007). Es importante destacar que todas estas acciones de señalización y modulación que hemos citado anteriormente pueden variar como consecuencia de la coactivación de diferentes receptores P2Y expresados en los diferentes sistemas celulares.

Como ejemplos de la modulación cruzada en las vías de señalización activadas por los receptores P2Y y otros canales iónicos activados por ligando, se ha descrito la inhibición de la

conductancia del receptor NMDA del glutamato por el P2Y₁ en neuronas piramidales de corteza de rata (Luthardt y cols., 2003) (Erb y cols., 2006) (Lee y O'Grady, 2003). Esta inhibición no depende de la activación de la proteína G, y puede producirse por una interacción proteína-proteína de forma directa. Los receptores P2Y₄ y P2Y₂, por el contrario, tenían respuestas facilitadas en las corrientes inducidas por NMDA en subpoblaciones de esas neuronas, habiéndose descrito una interacción directa entre este receptor con el P2Y₄ en las neuronas granulares de cerebelo (Cavaliere y cols., 2004). El P2Y₄ induce asimismo la liberación de glutamato que activa el receptor mGluR5 tipo I y este a su vez, vía Gq/PLC/IP₃/Ca²⁺/CaMKII, facilita las corrientes activadas por los receptores de NMDA (Wirkner y cols., 2007b).

Los P2Y también modulan a los receptores P2X, como se ha descrito para el P2Y₁ que inhibe al P2X₃, facilitando su desensibilización, vía proteína G, en neuronas de neuronas del ganglio espinal dorsal (DRG) y en células HEK293 (Gerevich y cols., 2005) (Gerevich y cols., 2007). Mientras que el P2X₁ ve potenciada su afinidad por su agonista específico, el αβ-meATP, por la acción de los receptores P2Y₁ y P2Y₂, coexpresados en oocitos de *Xenopus* (Vial y cols., 2004b). También se han descrito interacciones en las vías de señalización de los P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄ con los receptores de adenosina en astrositos de cerebelo, donde la respuesta a ATP se vio potenciada, por un lado por los receptores A2B de adenosina a través de la liberación de subunidades Gβγ, y por otro, por el dinucleósido polifosfato Ap5A, a través de una ruta dependiente de MAP quinasas (Alloisio y cols., 2004) (Delicado y cols., 2005) (Jimenez y cols., 1998) (Jimenez y cols., 2002). Por último, existe en la bibliografía numerosos ejemplos de interacciones entre receptores P2Y y receptores de factores neurotróficos (Volonte y cols., 2006) (Arthur y cols., 2005) (Franke y cols., 2006).

1.5.3.- Farmacología de los receptores P2Y.

Como hemos nombrado anteriormente, los receptores P2Y pueden diferenciarse según sus diferentes características estructurales, incluyendo la especificidad por sus ligandos (von Kugelgen, 2006) (Guile y cols., 2001). Esta caracterización no resulta, sin embargo, nada fácil, teniendo en cuenta los numerosos condicionantes que hay que tener en cuenta a la hora de estudiar los receptores purinérgicos y que hemos citado anteriormente (apartado 1.3).

Receptor P2Y₁: Este receptor es activado preferentemente por nucleótidos de adenina difosfato y no por nucleótidos de uracilo, pertenece al grupo de los receptores que se activan por ADP, al que también pertenecen los receptores P2Y₁₂ y P2Y₁₃. Por ello, se han realizado numerosos esfuerzos para conseguir ligandos selectivos para cada uno de estos receptores, pudiendo así distinguirlos más fácilmente. Entre ellos, destaca el MRS-2365 que muestra una mayor selectividad por el P2Y₁ que por el P2Y₁₂ o el P2Y₁₃, y una mayor afinidad que el

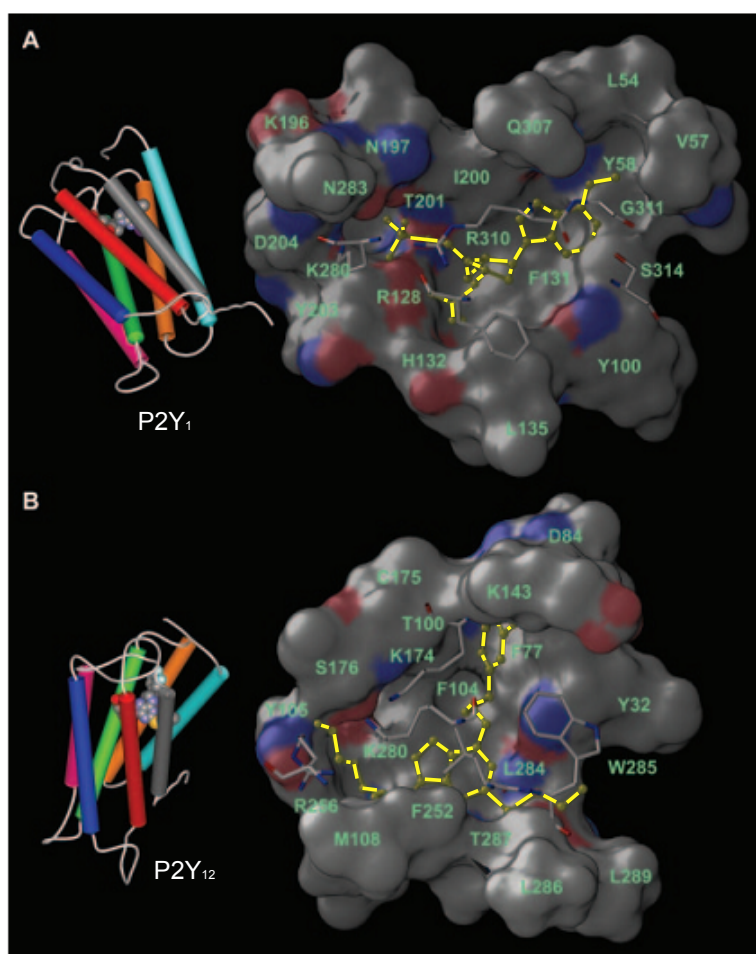


Figura 8.- Representación de la topografía de los receptores P2Y₁ A) y P2Y₁₂ B). En la figura se muestra las zonas de interacción para los antagonistas específicos y MRS2500 para el P2Y₁, y AZD6140 para el P2Y₁₂. Imagen tomada de la revisión de Abbracchio y cols 2006.

2MeSADP. El ligando de elección para los receptores P2Y cuyo ligando endógeno es el ADP suele ser el 2MeSADP ya que es más estable y, en el caso del P2Y₁, 10 veces más potente que el ligando endógeno (Chhatiwala y cols., 2004) (Waldo y Harden, 2004). El 2MeSATP también estimula el P2Y₁ en rata, con potencia similar al 2MeSADP. El propio ATP y sus análogos pueden actuar como agonistas o antagonistas de este receptor (Waldo y Harden, 2004) (Palmer y cols., 1998) (Hechler y cols., 1998b), aunque el efecto del ATP parece ser debido en realidad al ADP que se produce por el efecto de las ectonucleotidasas (Ralevic y Burnstock, 1998). En el campo de los antagonistas destacan el MRS-2500, muy potente y estable (Kim y cols., 2003a) (Hechler y cols., 2006), y los derivados de adenosina bifosfato, MRS-2279 y MRS-2179, siendo este último, el más utilizado (Boyer y cols., 2002) (Boyer y cols., 1998). El P2Y₁ también muestra sensibilidad por el PPADS, el azul reactivo 2 (RB2) y la suramina.

Receptor P2Y₂: Activado por nucleótidos de adenina y uridina trifosfato, es prácticamente insensible a nucleótidos difosfatos. El MRS-2698 es un agonista muy potente y 300 veces más

selectivo por el P2Y₂ que por el P2Y₄ (Ivanov y cols., 2007). El Denufusol (INS37217) es un agonista dinucleotídico análogo del UTP, selectivo para el P2Y₂ que está siendo probado en pacientes con fibrosis quística (Yerxa y cols., 2002) (Deterding y cols., 2005), habiendo pasado recientemente a fase 3 de ensayo clínico (Kellerman y cols., 2008). Como antagonistas propuestos se encuentran el ARC-126313, de Astra-Zeneca, (Guile y cols., 2001) (Jacobson y cols., 2004) y la tangeretina, un flavonoide que actúa como antagonista no competitivo (Kaulich M, 2003). También es sensible a suramina y RB2, pero insensible a PPADS (Mateo y cols., 1996).

Receptor P2Y₄: Este receptor es activado preferentemente por nucleótidos de uridina trifosfato, mientras que no muestra respuesta frente a los nucleótidos difosfato (Nicholas y cols., 1996a). El P2Y₄ humano es considerado como un pirimidinoceptor (Communi y cols., 1995). El denufusol actúa también como agonista de este receptor. En cuanto al P2Y₄ de rata y ratón, resulta estimulado con igual potencia por UTP y ATP, y también el Ap₄A actúa como buen agonista (Webb y cols., 1998). En cuanto a los antagonistas, este receptor es sensible a PPADS y RB2, e insensible a suramina (Communi y cols., 1996b). En ciertos casos, el ATP puede actuar como antagonista competitivo (Kennedy y cols., 2000).

Receptor P2Y₆: Este receptor es igualmente un pirimidinoceptor, 100 veces más sensible a UDP que a UTP (Nicholas y cols., 1996a). El ADP y el 2MeSADP son agonistas débiles en humano y rata. También se ha desarrollado el INS-48823, análogo del Up₃U, como agonista estable y potente de este receptor (Pendergast y cols., 2001). Como antagonistas destacan el MRS-2575 y el MRS-2578 en humano y rata (Mamedova y cols., 2004). En cuanto a los no específicos, es sensible a RB2, PPADS y suramina.

Receptor P2Y₁₁: Su agonista natural es el ATP, aunque la potencia de éste es relativamente baja. Recientemente se ha descrito que también es activado por agonistas propios de los P2X como (α meATP y BzATP), débilmente por los difosfatos (ADP) y no resulta activado por los nucleótidos de uracilo o los dinucleótidos polifosfato (King y Townsend-Nicholson, 2008). En algunos modelos como las células 1321N1 de astrocitoma se ha descrito al NAADP⁺ y al β -NAD⁺ como agonistas de este receptor (Moreschi y cols., 2008) (Moreschi y cols., 2006). El ARC-6785MX actúa como un potente agonista en el rango del μ M (Communi y cols., 1999). Con respecto a los antagonistas, se están intentando desarrollar antagonistas selectivos para este receptor, sobre todo tras el descubrimiento de la participación clave del residuo Arg268 del segmento TM6 en el reconocimiento estereoespecífico de ligandos (Ecke y cols., 2008a). El compuesto NF157, derivado de la suramina, es efectivo en rango nanomolar, aunque no resulta selectivo, ya que también afecta a los receptores P2X1, P2X2 y P2X3 (Ullmann y cols., 2005). La suramina inhibe el receptor de forma más potente que el RB2, mientras que el PPADS no muestra actividad (Communi y cols., 1999). En estudios recientes se ha visto que el Reactive

Red parece ser un buen antagonista y podría servir para diferenciar respuestas mediadas por este receptor (King y Townsend-Nicholson, 2008). Hasta la fecha, no se han clonado ortólogos en rata o ratón del P2Y₁₁.

Receptor P2Y₁₂: El receptor P2Y₁₂ de mamíferos, originariamente identificado como el receptor P2T de las plaquetas, es otro de los receptores de ADP, junto con el P2Y₁ y P2Y₁₃. Se puede distinguir de los anteriores en que presenta una afinidad de entre 50 y 100 veces mayor por el 2MeSADP que por el ADP (Hollopeter y cols., 2001). El ATP actúa como agonista en ciertos tipos celulares y como antagonista en plaquetas (Abbracchio y cols., 2006). Los antagonistas del P2Y₁₂ están muy desarrollados, ya que su bloqueo es una diana muy importante para las fármacos antitrombóticas, como es el caso del clopidogrel y el prasugrel (Hollopeter y cols., 2001) (Cattaneo, 2007). Dentro de estos antagonistas se encuentran el cangrelor y el AR-C67085, que se desarrollaron como antagonistas competitivos muy potentes, aunque ambos bloquean también el P2Y₁₃, y el último de ellos, ha sido recientemente descrito también como agonista del P2Y₁₁ (Marteau y cols., 2003) (Kunapuli y cols., 2003). El AR-C78511KF, presentado como antagonista, es en realidad un agonista inverso (Ding y cols., 2006). El clopidogrel, usado normalmente como fármaco antitrombótico mucho antes de que se conociera su receptor diana y la tiopidina, son profármacos metabolizadas *in vivo*, cuyos metabolitos inhiben de forma irreversible al P2Y₁₂ en plaquetas (Savi y Herbert, 2005) (Storey, 2006). En este mismo sentido actúa el prasugrel y su metabolito activo el R138727 (Angiolillo y cols., 2008), que inhibe el receptor por interacción con los residuos de cisteína 97 del TM3 y de cisteína 175 del segundo bucle extracelular, siendo más potente y actuando de formas más rápida que el clopidogrel (Algaier y cols., 2008). Otros antagonistas, como el AZD-6140, o el propio cangrelor, presentan la ventaja de que su tiempo de respuesta es corto y su inhibición reversible (Cattaneo, 2007) (Boeynaems y cols., 2005). El RB2 y la suramina actúan como antagonistas no selectivos de este receptor, mientras que el PPADS no tiene efecto.

Receptor P2Y₁₃: Este receptor en humano es activado por ADP y muy potentemente por 2MeSADP, mientras que el ortólogo de rata es más selectivo por el ADP que por el 2MeSADP, lo que permite su diferenciación con respecto al receptor P2Y₁₂. Entre los antagonistas destacan el novedoso MRS-2211 y el MRS-2603, que actúan mucho más potentemente que el PPADS (Kim y cols., 2005). Estos antagonistas son inactivos frente al P2Y₁₂, lo que hace más fácil su diferenciación, aunque el MRS-2603 también tiene efecto sobre el P2Y₁. El cangrelor y el 2MeSAMP antagonizan también este receptor, a ciertas concentraciones (Jantzen y cols., 1999). Como antagonistas no selectivos tenemos el RB2, suramina y PPADS.

Receptor P2Y₁₄: Este receptor es el último P2Y clonado hasta la fecha. Responde específicamente a azúcares activados como UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-glucorónico y

UDP-N-acetilglucosamina. No responde a adenina o uracil nucleótidos (Chambers y cols., 2000) (Abbracchio y cols., 2003) (Freeman y cols., 2001). No se han descubierto aún antagonistas de este receptor, aunque recientemente se ha comprobado que el UDP actúa como antagonista competitivo del P2Y₁₄ humano, mientras que es un potente agonista del P2Y₁₄ de rata (Fricks y cols., 2008).

1.5.4.- Distribución y Funciones de los P2Y

.-Receptores P2Y en el sistema inmune.

Los receptores P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁ y P2Y₁₃ han sido detectados a nivel de RNAm en bazo, mientras que en timocitos se encuentran tanto el P2Y₁ como el P2Y₂, regulando este último la producción de prostaglandinas y mediando acciones mitogénicas en estas células. El P2Y₂ es igualmente el receptor P2Y principalmente expresado en macrófagos, aunque también se han encontrado otros receptores como el P2Y₁, P2Y₄, P2Y₁₁ y P2Y₁₂ en humano (del Rey y cols., 2006) (Bowler y cols., 2003) (Coutinho-Silva y cols., 2005). Tanto el P2Y₁ como el P2Y₂ se encuentran en los neutrófilos, regulando la adhesión de estos a las células endoteliales, mientras que en los eosinófilos, linfocitos y monocitos se han identificado por RNAm los P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁. El P2Y₁₁ media en los monocitos la semimaduración promovida por el ATP (Wilkin y cols., 2001) (Schnurr y cols., 2003), mientras que el UDP induce, a través del receptor P2Y₆ la producción de IL-8 (Warny y cols., 2001). Tanto el P2Y₁ como el P2Y₂ inducen la liberación de histamina (Schulman y cols., 1999), al igual que intervienen en la migración celular y la quimiotaxis (Abbott, 2000).

Receptor	Potencia de agonistas (EC ₅₀)	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
P2Y ₁	2MeSADP > ADPβS > 2MeSATP = ADP > ATP UTP, UDP inactivos Ap ₃ A > Ap ₂ A	MRS 2279 > MRS 2179 > Suramina > PPADS	G _q /G ₁₁ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Plaquetas, cerebro, placenta, próstata, endotelio, corazón, músculo esquelético, tracto digestivo, células gliales, osteoclastos.
P2Y ₂	ATP ≈ UTP > Ap ₄ A ADP, UDP y 2MeSATP inactivos	Suramina > Azul reactivo 2, ARC126313 MRS-2698	G _q /G ₁₁ ; G ₀ , G ₁₂ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Músculo esquelético, epitelio respiratorio, hueso, pulmón, pituitaria, endotelio de microvasculatura coronaria, bazo, linfocitos, osteoblastos, riñón.
P2Y ₄	UTP > UTPγS >> ATP, UDP (agonistas parciales) UTP = ATP = Ap ₄ A (rata)	PPADS Azul reactivo 2 (rata) > Suramina	G _q /G ₁₁ ; G ₁₀ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Intestino, cerebro, pituitaria, placenta, corazón, pulmón, músculo liso vascular, células endoteliales.
P2Y ₆	UDPβS > UDP > UTP > ADP > 2MeSATP	Azul Reactivo 2 > PPADS > Suramina, MRS2578	G _q /G ₁₁ PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺	Placenta, bazo, riñón, corazón, aorta, intestino, cerebro, timo, pulmón
P2Y ₁₁	ATPγS ≈ BzATP > ATP > 2MeSATP	Suramina > Azul reactivo 2, NF157, 5'-AMPs	G _q /G ₁₁ , G _s PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺ Activación AC	Cerebro, placenta, pituitaria, intestino, sistema inmune, granulocitos.
P2Y ₁₂	2MeSADP = 2MeSATP >> ADP >> ATP UTP, UDP inactivos	AR-C69931, AR-C66096, Clopidogrel, Ticlopidina, Azul Reactivo 2, Suramina, 2MeSAMP, CTS0547, AZD6140, INS49266, PSB0413, PPADS inactivo, BzATP (rata)	G _{i/o} Inhibición AC Activación RhoA	Plaquetas humanas, cerebro.
P2Y ₁₃	2MeSADP ≥ 2MeSATP > ADP >> ATP UTP, UDP inactivos	AR-C69931 > PPADS > Suramina 2MeSAMP MRS2211	G _{i/o} PLCβ/IP ₃ /Ca ²⁺ Inhibición AC Activación RhoA	Bazo, cerebro, células gliales, médula ósea, ganglios linfáticos endotelio.
P2Y ₁₄	UDP-glucosa > UDP-galactosa > UDP-Glucurónico > UDP-N-acetilglucosamina ATP, ADP, UTP, UDP inactivos		G _{i/o} Activación PLC	Placenta, adiposo, estómago, intestino, cerebro, bazo, corazón, pulmón.

Tabla 3.- Clasificación de los receptores P2Y. Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de Abbracchio y cols, 2006; Burnstock, 2007 y King y cols, 2003.

.-Receptores P2Y en el sistema endocrino.

En los tejidos secretores destaca sobre todo el receptor P2Y₂, presente en la pituitaria anterior, donde modula la liberación de la prolactina, la secreción de aldosterona en la glándula adrenal, y controla, junto con el P2Y₆ la liberación de insulina en las células β de los islotes en páncreas (Parandeh y cols., 2008). Igualmente el receptor P2Y₂ está envuelto en la secreción de estradiol y testosterona en las células testiculares de Sertoli y Leydig (Ko y cols., 2003) (Foresta y cols., 1996). En el ovario y placenta este receptor media también funciones secretoras, mientras que participa en la regulación del balance iónico en las glándulas salivares (Turner y cols., 1999). El P2Y₂ junto con el P2Y₁ y el P2Y₄ regula la lipogénesis en los adipocitos marrones, mientras que en el páncreas endocrino, parecen regular la homeostasis de glucosa (Leon y cols., 2005) (Abbracchio y cols., 2006). Estos datos han sido comprobados para el P2Y₁ en los estudios realizados con ratones KO, que mostraron alteraciones en los niveles de glucosa y en el peso corporal, además de alteraciones en la agregación plaquetaria, como veremos más adelante (Leon y cols., 2005) (Leon y cols., 1999) (Fabre y cols., 1999).

.-Receptores P2Y en hígado, intestino y sistema biliar.

A nivel intestinal actúan, por un lado, los receptores P2Y₁ y P2Y₁₁ que inducen la relajación del músculo liso del tracto gastrointestinal, mientras que los receptores P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₆, y sobre todo el P2Y₄, participan en la secreción, lo que se confirma los datos obtenidos del ratón KO para el P2Y₄ (Robaye y cols., 2003). En los hepatocitos se encuentran expresados los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₃, regulando la gluconeogénesis, glicolisis y la endocitosis de proteínas HDL (Malaval y cols., 2009) (Dixon y cols., 2005). En el epitelio del tracto biliar también están expresados los receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ que parecen estar regulando la secreción de bilis. (Abbracchio y cols., 2006).

.-Receptores P2Y en riñón y vejiga.

Los receptores P2Y están muy expresados en riñón, el P2Y₁, P2Y₄ y P2Y₆ median la reabsorción de iones, agua y nutrientes en el asa de Henle y en el túbulo proximal. El receptor P2Y₂ predomina en el túbulo distal mediando la secreción de iones, ácidos y toxinas mientras que los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ están relacionados con el transporte de agua e iones en el túbulo colector (Bailey y cols., 2000) (Bailey y Shirley, 2009). En el glomérulo se expresan los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₁₁ y P2Y₁₂ en las células mesangiales, los P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₆ en podocitos y los P2Y₂ en las células endoteliales. En cuanto a la funcionalidad en vejiga, Bolego y cols. (Bolego y cols., 1995) sugieren la participación de los P2Y en la contracción y relajación de la vejiga y también se han descrito distintas funciones mediadas por

receptores purinérgicos en vejiga humana (Palea y cols., 1993).

.-Receptores P2Y en el sistema respiratorio.

En este sistema destacan principalmente los receptores P2Y₂ y P2Y₆ que se expresan en el músculo liso asociado al pulmón, mientras que el receptor P2Y₂ está asociado a la secreción mucosa del epitelio pulmonar y a la aclaración de las secreciones, lo que le hace una diana terapéutica muy importante en el tratamiento de enfermedades como la fibrosis quística (Kellerman y cols., 2002). Estos datos se confirman con las alteraciones observadas en las secreciones pulmonares en los ratones KO para el P2Y₂ (Homolya y cols., 1999) (Cressman y cols., 1999).

.-Receptores P2Y en hueso y cartílago.

Los receptores P2Y están implicados en la formación del hueso. El receptor P2Y₂ se expresa en osteoblastos donde media la inhibición de la formación ósea, mientras que el P2Y₁ en los osteoclastos, media la reabsorción (Hoebertz y cols., 2002). Los condrocitos expresan tanto P2Y₁ como P2Y₂, que median tanto la reabsorción de cartílago como la liberación de prostaglandinas (Hoebertz y cols., 2001) (Hoebertz y cols., 2000) (Berenbaum y cols., 2003).

.-Receptores P2Y en piel, endotelio y sistema sensorial.

Los receptores P2Y participan, asimismo en la renovación de los queratinocitos en el epitelio estratificado y, tanto el P2Y₁ como el P2Y₂, modulan la proliferación celular en las células basales. El P2Y₁ y el P2Y₂ median también la liberación de óxido nítrico en el endotelio vascular, provocando la vasodilatación, proliferación celular y expresión de moléculas de adhesión para los monocitos (Kieffmann y cols., 2009) (Pirotton y cols., 1996). También se han encontrado receptores P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁ y P2Y₁₂ expresados en vasos sanguíneos y estudios realizados en el ratón KO para el P2Y₆ muestran alteraciones funcionales en el endotelio vascular y en el músculo vascular liso, además de alteraciones en células del sistema inmune (Bar y cols., 2008). En cuanto al sistema sensorial, el P2Y₂ está fuertemente expresado en el ojo, mediando respuestas tróficas en córnea y retina, mientras que el P2Y₁ parece intervenir en la secreción del cuerpo ciliar (Pintor y cols., 2004) (Crooke y cols., 2008) (Guzman-Aranguez y cols., 2007). En el sistema auditivo los receptores P2Y₂ y P2Y₄ están relacionados con la función de la cóclea, mientras que los receptores P2Y₂ y P2Y₆ están también relacionados con la función olfativa (Housley, 2000) (Housley y cols., 2009).

.-Receptores P2Y en plaquetas.

Las plaquetas expresan tanto P2X₁ como P2Y₁ y P2Y₁₂, siendo necesaria la coactivación de estos dos últimos para una correcta agregación de las plaquetas (Gachet, 2001) (Hechler y cols., 2005). El receptor P2Y₁ se encuentra en un número de unas 150 unidades por plaqueta, (Hechler y cols., 2003), e inicia, a través de G_q, la movilización de calcio de los reservorios intracelulares, que media el cambio de forma y una débil y transitoria agregación plaquetaria (Hechler y cols., 1998a) (Hechler y cols., 1998b) (Jin y Kunapuli, 1998) (Savi y cols., 1998). El receptor P2Y₁ también participa en la agregación plaquetaria activada por el colágeno (Leon y cols., 1999). Como hemos indicado anteriormente, estos datos se confirman con los resultados obtenidos en el ratón KO para P2Y₁ (Fabre y cols., 1999). En cuanto al receptor P2Y₁₂, resulta imprescindible para que se produzca la agregación plaquetaria completa activada por ADP (Schoneberg y cols., 2007), como también se deduce de los estudios llevados a cabo con los ratones KO para este receptor (Cattaneo, 2006) (Foster y cols., 2001). El P2Y₁₂, además, a través de su acoplamiento a la proteína Gα_{i2}, inhibe la adenilato ciclasa y la PI3K, resultando en una potenciación de la respuesta y estabilización clave de los agregados (Trumel y cols., 1999) (Kauffenstein y cols., 2001). Por otra parte, los polimorfismos que presenta el receptor P2Y₁₂ en las plaquetas pueden producir variabilidad en el nivel de agregación plaquetaria en humanos y pueden estar asociados a determinadas patologías cardiovasculares (Bierend y cols., 2008).

.-Receptores P2Y en el sistema nervioso.

Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo de todo el Sistema Nervioso, como se puede observar en la tabla (tal, poner tabla de agonistas y distribución del Fischer, 2007, 2429). Los receptores P2Y median importantísimas funciones en este sistema, como son la generación de un comportamiento adecuado del organismo a través de la regulación de la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores y la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración.

La activación de los receptores P2Y en la postsinapsis, ya sean los P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁, así como los P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, lleva al incremento de la concentración intracelular de calcio, la activación de vías de señalización mediadas por este segundo mensajero y a la modulación de varios canales iónicos, regulándose la excitabilidad neuronal, como se ha comentado anteriormente (Lechner y Boehm, 2004) (Sperlagh y cols., 2007). Igualmente la activación de los receptores P2Y presinápticos (P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄) junto con algunos P2X (P2X₁, P2X_{2/3}, P2X₃ y P2X₇) pueden modular la liberación del propio ATP, así como de otros neurotransmisores (Rodrigues y cols., 2005).

Este ATP y los otros neurotransmisores pueden actuar sobre los receptores presentes en las células astrogliales próximas, tanto P2X2, P2X4, P2X5 y P2X7, como P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₁₄, produciendo a su vez incrementos de la concentración intracelular de calcio en estas células y la liberación de “gliotransmisores” (ATP, glutamato, aspartato, D-serina, óxido nítrico y otras sustancias neuroactivas) (Volterra y Meldolesi, 2005) (Bezzi y cols., 2001) (Fellin y cols., 2006) (Fischer y Krugel, 2007) (Inoue y cols., 2007). Esta liberación se produce principalmente por vías de exocitosis dependientes de calcio (Montana y cols., 2006), aunque la implicación de otros sistemas como canales, transportadores, conexinas, panexinas o proteínas ABC no puede ser descartada (Volterra y Meldolesi, 2005). Estos gliotransmisores pueden inducir, a su vez, la liberación de ATP, glutamato, etc., desde los astrocitos activados, incrementando la excitabilidad de las neuronas próximas y generando una retroalimentación positiva, así como estimular otras células cercanas como las células del endotelio vascular, microglía etc. (Koizumi y cols., 2002). En este sentido, la astrogliosis generada tras un trauma, isquemia o fallo metabólico parece estar mediada en parte por los receptores P2Y. El receptor P2Y₁₂, vía G_{i/o}/PI3K/Akt, y el receptor P2Y₄ podrían participar en el aumento de la quimiotaxis inducido por el ATP en la microglía (Haynes y cols., 2006) (Ohsawa y cols., 2007). En este mismo tipo celular, el P2Y₁₂, vía p38, estaría involucrado en la patogénesis relacionada con el dolor neuropático, tras generarse daño en los nervios periféricos (Tozaki-Saitoh y cols., 2008) (Kobayashi y cols., 2008). El P2Y₆, en cambio, parece estar implicado en la mediación de las acciones fagocíticas de estas células que permiten limpiar el tejido dañado de células muertas, impidiendo que se extienda el daño. (Koizumi y cols., 2007).

Los receptores P2Y también están asociados en el Sistema Nervioso a la señalización trófica y degenerativa. Sus acciones pueden contribuir al crecimiento celular, proliferación, diferenciación o muerte a través de vías de señalización mediadas por PLA2, PLD, MAPK y Akt (Brambilla y cols., 2002) (Volonte y cols., 2003) (von Kugelgen y Wetter, 2000). Los P2Y activan de forma transitoria las ERK, junto con proteínas activadas por estrés (JNK, p38 y Big MAP kinase 1 (ERK5)) vía cRaf1 o activadores MEK (Widmann y cols., 1999) (Erb y cols., 2006). Estas cascadas participan en cerebro en procesos de proliferación, diferenciación, y también en el mantenimiento del equilibrio protección/ muerte celular. Es interesante destacar que los nucleótidos muestran efectos sinérgicos en la proliferación con los factores de crecimiento o citoquinas (Neary y cols., 1999), bien por la activación paralela de las MAPK o por la transactivación de los receptores de factores de crecimiento (Neary y Zhu, 1994) (Lenz y cols., 2000).

En cuanto a los fenómenos de diferenciación y proliferación son varios los tipos celulares dentro del Sistema Nervioso Central que pueden ser estimulados por los nucleótidos, desencadenándose procesos proliferativos. Entre estos, se encuentran las células endoteliales,

los fibroblastos, los progenitores neurales etc. (Rathbone y cols., 1992) (Heine y cols., 2006). Varios estudios llevados a cabo en neuroesferas describen el efecto sinérgico del P2Y₁ en la proliferación activada por los factores de crecimiento (Mishra y cols., 2006), participando tanto en la neurogénesis adulta como embrionaria (Moore y cols., 2002). Según otros estudios, el P2Y₂ se encuentra también implicado en la potenciación de la supervivencia neuronal y en el crecimiento de neuritas mediada por el NGF en neuronas de DRG en cultivo (Arthur y cols., 2006a), y recientemente, tanto este receptor como el P2Y₁ han sido relacionados con la potenciación de la proliferación y diferenciación neural en los modelos embrionarios de células P19 de carcinoma (Resende y cols., 2008). El receptor P2Y₂ asimismo está implicado en la liberación de factores tróficos en astrocitos y regulación de elementos antiapoptóticos en células 1321N1 de astrocitoma (Chorna y cols., 2004) (Arthur y cols., 2006b). Además, el receptor P2Y₄ también ha sido relacionado con la facilitación de la neurogénesis en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Cavaliere y cols., 2005). En este sentido, el ATP liberado masivamente de las células dañadas en cerebro puede ser clave para la iniciación de procesos de reparación y regeneración (Abbracchio y Burnstock, 1998), teniendo en cuenta que la activación de los receptores P2Y también puede llevar a la activación de las respuestas en los astrocitos, relacionados con la “gliosis” (Neary, 1996) (Neary y cols., 1994).

Son pocos los trabajos que implican directamente a los receptores P2Y con la apoptosis. Algunos de estos estudios relacionan al P2Y₁ con la activación de la apoptosis vía ERK1/2 (Sellers y cols., 2001), mientras que en otros estudios serían el P2Y₆ o el P2Y₁₂ los que actuarían previniendo la apoptosis frente a estímulos como el TNF α (Kim y cols., 2003c) (Mamedova y cols., 2006). Esto indicaría el posible papel dual de los receptores P2Y en la regulación de la muerte celular programada.

1.5.5.- Receptores P2Y y funciones terapéuticas.

Los receptores P2Y son una posible diana terapéutica que cada vez cobra más interés. Un ejemplo de ello son los antagonistas del P2Y₁ y del P2Y₁₂ empleados como agentes antitrombóticos utilizados ampliamente en clínica, como el clopidogrel, que es el principio activo del fármaco comercializado como Plavix (Burnstock, 2002) (Jacobson y cols., 2002) (Cattaneo, 2007) (Boeynaems y cols., 2005). También se han propuesto antagonistas del receptor P2Y₁₁ en el tratamiento de la hipertensión o del fallo cardíaco congestivo. (Balogh y cols., 2005). El P2Y₂ y el P2Y₆ asimismo son dianas terapéuticas en las enfermedades cardíacas. El P2Y₂, es capaz de reducir la expresión de la VCAM-1, y su inhibición puede prevenir la inflamación asociada con la aterosclerosis (Seye y cols., 2004). De manera muy intensiva se estudia su posible participación en enfermedades inflamatorias (Guile y cols., 2001). Los P2Y son objetivos potenciales muy a tener en cuenta en el tratamiento de enfermedades como la

osteoporosis, inflamación, diabetes (Schnurr y cols., 2003) (Solini y cols., 2003), o la fibrosis quística. Esta enfermedad se produce como consecuencia de una alteración en el transporte de Cl^- , lo que lleva a la obstrucción y colonización de bacterias patógenas de las vías respiratorias. Su tratamiento a través del compuesto INS-37217 o denufosol, agonista del receptor P2Y_2 , está actualmente en fase clínica III (Kellerman y cols., 2008) (Yerxa y cols., 2002). También se emplean antagonistas de receptores P2Y en el tratamiento del síndrome de ojo seco (Tauber y cols., 2004), ya que median procesos como la inducción de la secreción lacrimal, producción de lisozimas y aceleración de la reparación del daño en la córnea (Guzman-Aranguez y cols., 2007). En el Sistema Nervioso, se postula la utilización de los ligandos P2Y para el tratamiento del dolor, epilepsia y trastornos neurodegenerativos /neuroinflamatorios, como son el Alzheimer, Parkinson, Huntington o alteraciones neuronales motoras (Fischer y Krugel, 2007).

2.- EL CEREBELO

El cerebelo es una zona de gran importancia dentro del cerebro. Esta presente desde los vertebrados más antiguos y, aunque ha ido evolucionando, su estructura de ordenación y conexiones de las neuronas no ha variado. En un principio se pensó que el cerebelo tenía la única función, aunque muy importante, de suavizar, dar continuidad y armonía al movimiento y postura corporal. Estas acciones se realizarían por medio de la integración y procesamiento de la información sensorial que llega de la periferia y la coordinación para ajustar correctamente el movimiento. Actualmente se sabe que el cerebelo participa en también en la memoria a corto plazo, la cognición superior, planificación y realización de tareas, control de impulsos, mantenimiento de la atención y el habla. Además sus alteraciones podrían estar asociadas con algunas enfermedades como el autismo o la esquizofrenia.

2.1.- Anatomía del cerebelo.

Anatómicamente, el cerebelo se encuentra situado sobre el tronco del encéfalo apoyado sobre los pedúnculos cerebelosos (superior, medio e inferior), por los que se conecta al resto del cerebro y a través de los cuales circulan las vías aferentes y eferentes del cerebelo. En mamíferos, el cerebelo está formado por una sucesión de láminas o folia de disposición transversal que cruzan la línea media sin discontinuidad, de modo que, desplegadas, ocuparían una superficie considerable.

Dos fisuras horizontales profundas, la fisura primaria y la fisura posterolateral dividen al cerebelo en lóbulos: el lóbulo anterior (paleocerebelo) y posterior (neocerebelo) y el lóbulo floculonodular o arquicerebelo, respectivamente. Otras fisuras poco profundas subdividen los lóbulos anteriores en varios lobulillos (del I al X). En el plano longitudinal dos surcos crean una franja central denominada vermis, dejando los hemisferios cerebelosos a los lados. Éstos comprenden a su vez una región intermedia y una región lateral externa.

Cada porción del cerebelo tiene una especialización funcional, determinada por las conexiones de entrada y salida. El lóbulo floclunodular o arquicerebelo es la parte filogenéticamente más antigua y se relaciona de manera recíproca con el sistema vestibular, interviniendo en el mantenimiento de la postura corporal y los movimientos oculares. Por otro lado, los lóbulos anterior y posterior están involucrados en el control de los movimientos corporales, existiendo en ambos una segregación transversal de las conexiones. El vermis y la parte más próxima de los hemisferios (zona intermedia), constituyen la región denominada espinocerebelo. Reciben información visual, auditiva y somatosensorial de la cabeza y las partes proximales del cuerpo, a través de la médula espinal y el tronco encefálico. Se encargan de controlar la musculatura axial, la postura y la locomoción .

Por último, la región externa de los hemisferios, más desarrollada en el lóbulo posterior en paralelo con el gran desarrollo de la corteza cerebral en mamíferos, se denomina también cerebrocerebelo. Recibe aferencias corticales y de la médula espinal, proyectando, a través del

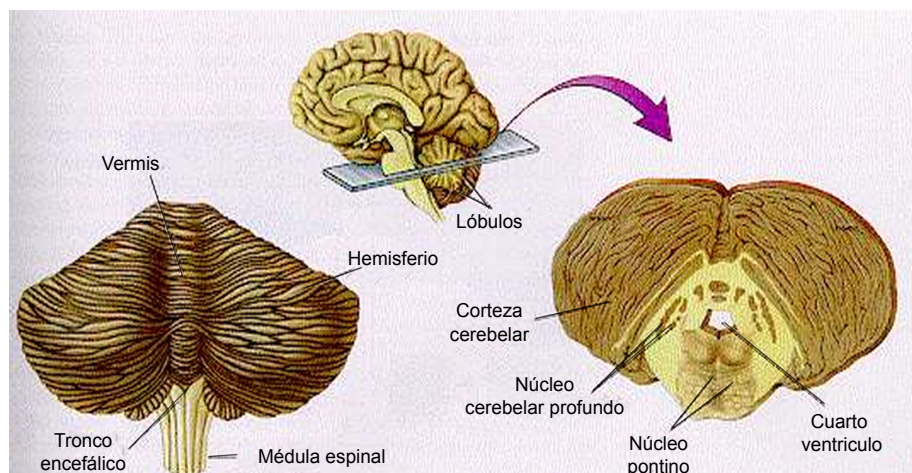


Figura 9.- Localización del cerebelo con respecto a otras estructuras del sistema nervioso central. Vista longitudinal y sagital.

núcleo dentado y el tálamo, sobre la corteza motora y premotora. De este modo, el cerebrocerebelo se ocupa de la planificación y coordinación de distintos grupos musculares para la realización de movimientos precisos y de alto grado de complejidad, así como de la comparación entre las órdenes motoras procedentes de la corteza cerebral con su resultado motor .

2.2.- Histología y citoarquitectura del cerebelo

Histológicamente el cerebelo está formado por una capa externa de materia gris denominada corteza cerebelosa, una zona más interna de materia blanca y tres partes de núcleos profundos llamados núcleo dentado, fastigial e interpuesto. Este último está formado a su vez por los núcleos globoso y emboliforme .

Introducción

La corteza cerebelosa se divide en tres capas, que de la superficie al interior se denominan *molecular*, *intermedia* (o de células de Purkinje) y *granular* (Figura 11).

En el exterior se sitúa la capa molecular. En esta capa se encuentra el árbol dendrítico de las *neuronas de Purkinje* y los axones de las neuronas granulares, formando las fibras paralelas que hacen sinapsis a su paso con las neuronas de Purkinje que encuentran en el trayecto. También podemos hallar en esta capa numerosas interneuronas inhibitorias: las *células estrelladas* y las *células en cesta*, que extienden sus axones hacia capas más internas. Las células estrelladas establecen sinapsis con las dendritas distales de las células de Purkinje mientras que las células en cesto “envuelven” los cuerpos de éstas.

Por debajo de esta capa más externa se sitúa la capa de células de Purkinje o capa intermedia, que alberga, principalmente los cuerpos de estas neuronas, que se disponen de forma ordenada y cuyos axones descienden hacia la materia blanca y núcleos profundos constituyendo la única vía eferente del cerebelo.

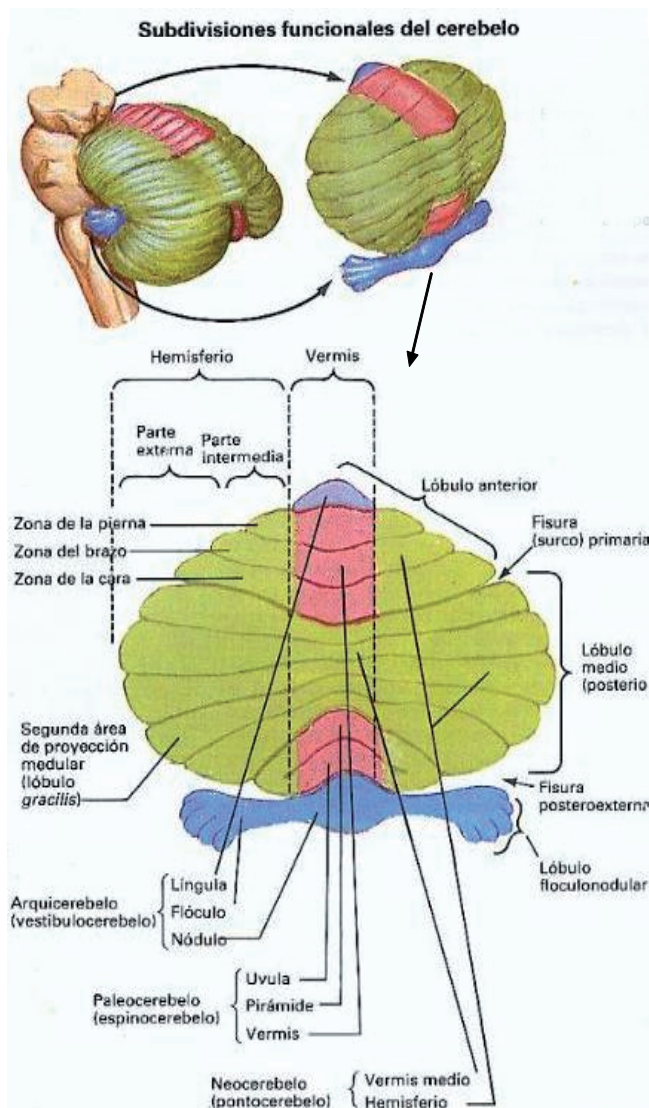


Figura 10.-Subdivisiones funcionales del cerebelo.

La *fisura primaria* y la *fisura posterolateral* dividen al cerebelo en el lóbulo anterior (*paleocerebelo*) y posterior (*neocerebelo*), y el lóbulo floculonodular o *arquicerebelo*, respectivamente. Otras fisuras poco profundas subdividen los lóbulos anteriores en varios lobulillos. En el plano longitudinal dos surcos crean una franja central denominada *vermis*, dejando los hemisferios cerebelosos a los lados. Éstos comprenden a su vez una región intermedia y una región lateral externa.

Por último y en la zona más interna del cerebelo se conoce como capa granular, formada principalmente por las pequeñas y numerosísimas *células granulares*. Los axones de estas neuronas ascienden y se bifurcan para formar las fibras paralelas de la capa molecular. Sus dendritas, 4-5 por célula, hacen sinapsis en las terminaciones engrosadas o rosetas de las fibras musgosas donde, además, confluyen los axones de las *células de Golgi*, conformando los llamados glomérulos cerebelosos. En la capa granular existen, además, dos tipos neuronales poco conocidos en sus aspectos electrofisiológicos, las *células de Lugaro*, a las que se supone una función similar a las de Golgi, y las *células en cepillo*, que mediante las fibras musgosas establecerían contactos con las células granulares.

La corteza cerebelosa contiene también numerosas células gliales entre las que destacan las *células epiteliales de Golgi o glía de Bergmann*, que envuelve a las neuronas de Purkinje y actúa de guía durante la migración de las células granulares. Además, encontramos otros tipos de *células gliales*, *astrocitos* y oligodendrocitos, a los que se les ha dado no solo un papel de soporte y mantenimiento del desarrollo de la corteza cerebelosa, sino también, una intervención directa en el circuito neuronal del cerebelo (Ito, 1984).

2.3.- Circuito neuronal cerebeloso, vías aferentes y eferentes.

La información llega al cerebelo por medio de tres tipos de fibras: musgosas, trepadoras y monoaminérgicas (figura 12) que constituyen dos grandes vías aferentes que llegan a las neuronas de Purkinje, mientras que cuenta solo con una única vía eferente formada por los axones de estas mismas neuronas.

Las vías aferentes pueden llegar de modo directo a través de las fibras trepadoras, o indirecto, desde las fibras musgosas por vía de las neuronas granulares. La estimulación reiterada de las fibras trepadoras sobre las neuronas de Purkinje genera una despolarización prolongada que se traduce en espigas complejas, formadas por una espiga inicial de gran amplitud seguida de un conjunto de potenciales de acción de baja amplitud y alta frecuencia (De Zeeuw, 1998). En contraste, las fibras paralelas producen potenciales de acción sencillos y breves o espigas simples (Martinez y cols., 1971). En un plazo más o menos largo, la despolarización inducida en la neurona de Purkinje por las fibras trepadoras puede disminuir la eficacia post-sináptica de las fibras paralelas. Este fenómeno se conoce como long term depression (LTD) o inhibición a largo plazo y juega un importante papel en el aprendizaje motor.

A esta integración de señales aferentes hay que sumarle la modulación inhibitoria de la señal por las interneuronas. Como resultado, la neurona de Purkinje envía una señal que será más o menos intensa, pero de naturaleza inhibitoria. Esta capacidad integradora y moduladora que ocurre en el cerebelo es la base de su papel en la coordinación, regulación y ajuste a varios niveles.

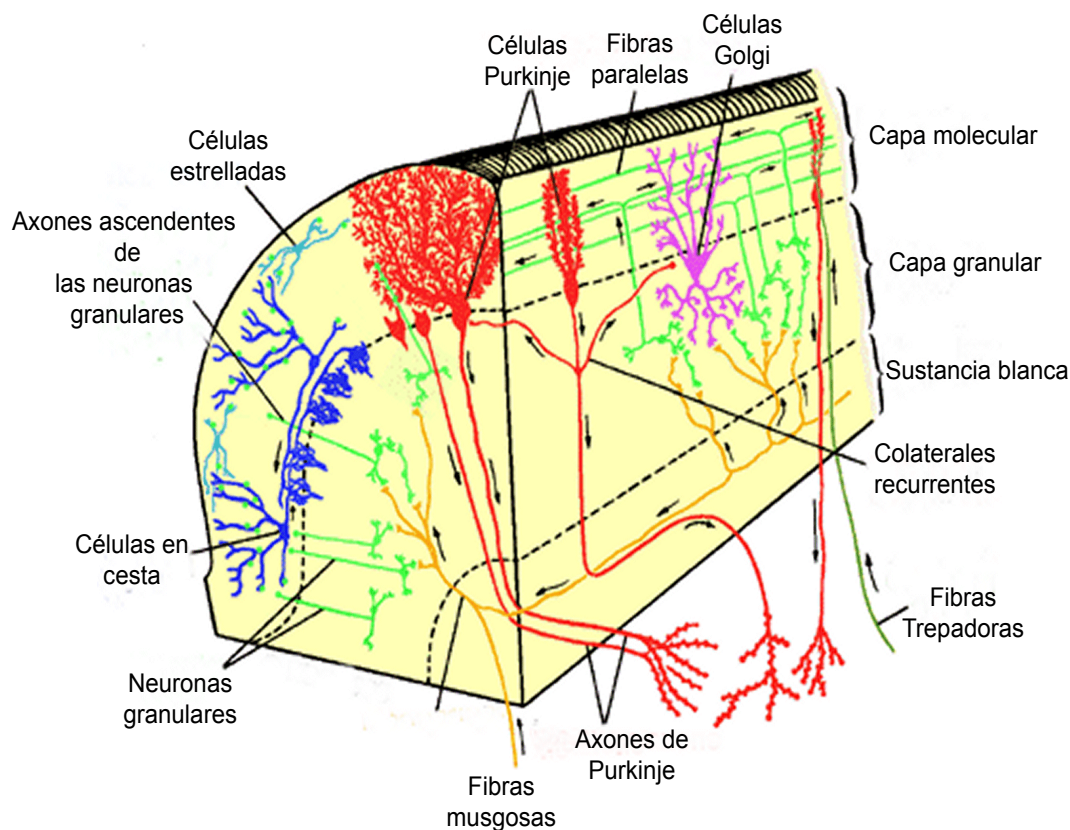


Figura 11- Organización general de la corteza cerebelosa. En el esquema se puede observar una circunvolución cerebelosa en eje transversal y longitudinal (izq. y dcha. respectivamente). Se puede observar la disposición de los principales tipos neuronales cerebelares así como la formación de las fibras paralelas y de las fibras aferentes trepadoras y musgosas.

La vía aferente, por su parte se proyecta finalmente sobre las neuronas de los núcleos profundos cerebelares y vestibulares, siendo ésta una inervación puramente inhibitoria mediada por el neurotransmisor GABA. Al mismo tiempo, esta vía eferente envía colaterales axónicas recurrentes que inhiben, a su vez, a las células de Purkinje, estrelladas y en cesto contiguas creando así un potente lazo inhibitorio.

2.4.- Avances en el conocimiento de las funciones del cerebelo.

El conocimiento de las funciones en las que está involucrado el cerebelo se ha ido incrementando a medida que han evolucionado las técnicas de estudio. Así pues, a parte de la función asignada en la coordinación del movimiento, se ha podido comprobar que el cerebelo está activo en gran cantidad de actividades que no guardan relación con la actividad motora (Schmahmann, 2004) (Allen y cols., 2005).

El cerebelo participa en el aprendizaje de las tareas motoras por medio del mecanismo de internalización de las subunidades GluR2 de los receptores de AMPA conocida como “depresión

a largo plazo” (LTD) (Ito, 2002). Las alteraciones en el cerebelo también están asociadas a trastornos cognitivos y afectivos (Exner y cols., 2004) debido a la interrupción de los circuitos de comunicación con la corteza cerebral. Los individuos afectados de autismo presentan un volumen y estructura anormal del cerebelo, lo que puede afectar a la conexión de los circuitos entre el cerebelo y el cerebro, alterando los mecanismos de aprendizaje (Herbert, 2006). Igualmente alteraciones en la estructura del cerebelo pueden estar asociados al desarrollo de la esquizofrenia. Otras alteraciones, como la ataxia espinocerebelar están también relacionadas con el cerebelo, debido a la ruptura que se produce entre las conexiones aferentes y eferentes del cortex prefrontal y estructuras subcorticales, entre las que se encuentra el propio cerebelo (Aleksseva y cols., 2005).

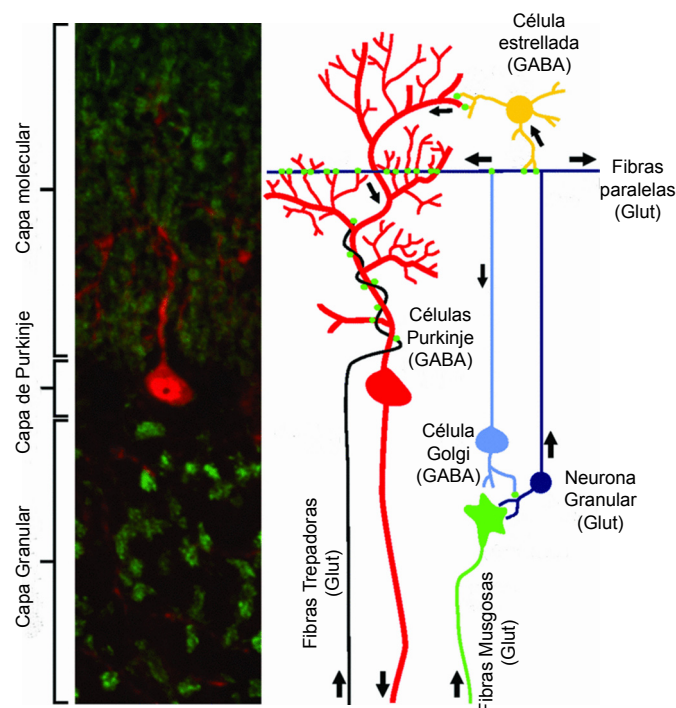


Figura 12.- Circuito de neurotransmisión de la corteza cerebelosa. En el esquema se muestran los diferentes neurotransmisores que participan en el circuito cerebeloso. El ATP podría liberarse junto con otros neurotransmisores como el GABA, glutamato, noradrenalina o serotonina.

Por lo tanto, y más allá de las funciones que inicialmente se asignaban al cerebelo, este cobra cada vez más fuerza en el estudio e investigación de determinadas enfermedades y en el campo de la neurociencia conductual.

2.5.- La neurona granular en el cerebelo.

Las neuronas granulares se identificaron a finales del siglo XIX, al tiempo que salían a la luz los primeros estudios sobre la organización histológica y celular de la corteza cerebelosa (Obersteiner, 1880) (Athias, 1897). Estas investigaciones desembocaron unos años después en

los trabajos de Santiago Ramón y Cajal, que describió con gran precisión y belleza, utilizando tinciones de Golgi, las transformaciones que experimentan los distintos constituyentes de la corteza cerebelosa durante su migración y desarrollo (Ramon y Cajal, 1911), (Ramon y Cajal, 1960). Desde entonces han sido numerosos los estudios que, confirmando aquellas elegantes descripciones, han tenido por objeto el desarrollo de la neurona granular.

Las células granulares del cerebelo son pequeñas neuronas con un soma de tamaño entre 6 y 10 μm , con un núcleo denso, que constituyen el tipo neuronal más abundante del cerebro (del orden de 10^{11} en humanos) y el 90% de las neuronas cerebelares. En la arquitectura del cerebelo ocupan una posición central, siendo la principal fuente de inervación hacia las neuronas de Purkinje con las que forman una red sináptica ortogonal perfectamente organizada y eficaz.

2.6.- La neurona granular como modelo de estudio de la apoptosis.

Las neuronas granulares, debido a su desarrollo posnatal y a la viabilidad de estas células en cultivo, son un excelente modelo para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares relacionados con la supervivencia/apoptosis y con la neuroprotección/ neurodegeneración tanto *in vivo* como *in vitro* (Contestabile, 2002). La apoptosis neuronal es un mecanismo fisiológico de control muy importante durante el desarrollo del sistema nervioso, pero sus alteraciones pueden llevar al desencadenamiento de enfermedades neurodegenerativas (Nijhawan y cols., 2000). Esta muerte programada está muy relacionada con la familia de Bcl-2, la familia de las caspasas, con el metabolismo mitocondrial, activación de oncogenes, quinasas y fosfatasa al igual que con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (Sastri y Rao, 2000) (Lossi y cols., 1998).

Los estudios llevados a cabo *in vivo* revelan que la apoptosis o supervivencia de las neuronas granulares depende en gran medida de su principal objetivo de conexión celular, las neuronas de Purkinje. Estas neuronas promueven la supervivencia de las neuronas granulares a través de la proteína Sonic hedgehog (Shh). Otras de las señales de diferenciación para estas neuronas pueden ser el BDNF, el bFGF o el IGF-I que estimulan la supervivencia de las neuronas granulares y sus progenitores (Chrysis y cols., 2001) (Dahmane y Ruiz i Altaba, 1999) (Schwartz y cols., 1997) (Cheng y cols., 2001). Estos mismos efectos se producen como consecuencia de la actividad del péptido liberado desde la pituitaria, el PACAP (Vaudry y cols., 2000). La señalización mediada por los receptores de NMDA es también importante para el mantenimiento o apoptosis de las neuronas granulares de cerebelo, variando los efectos de su señalización en función del momento del desarrollo en que se produzca (Contestabile, 2002).

Como hemos dicho previamente, los cultivos de neuronas granulares están muy bien establecidos, y la modificación de ciertos parámetros en estos cultivos supone una herramienta

vital para el estudio de la apoptosis. El requerimiento más importante, dentro de estos parámetros, para el mantenimiento de las neuronas granulares es la despolarización crónica de las células con concentraciones superiores a 20mM de K^+ , usualmente de 25mM. En presencia de las concentraciones fisiológicas de K^+ (5mM), las células entran en apoptosis (Balazs y cols., 1988). Esta necesidad de mantener un estado de excitación mantenida en las neuronas granulares parece mimetizar las conexiones que se establecen in vivo en las sinápsis excitatorias con las fibras musgosas, mientras las neuronas granulares se están diferenciando. Estas condiciones permiten el mantenimiento de ciertos niveles de calcio en el interior de la célula, que evitan la apoptosis (Contestabile, 2002).

Varios estudios han descubierto múltiples elementos que promueven la supervivencia de las neuronas granulares en cultivo, protegiéndolas de la apoptosis inducida como consecuencia del establecimiento de condiciones de bajo potasio (5mM). Estos elementos son, el propio restablecimiento de las condiciones despolarizantes en el cultivo, la señalización activada por niveles elevados de AMP cíclico y sus análogos, por el IGF-I, la forskolina, o el litio. Todos estos elementos tienen un punto en común y es que todos producen la inhibición de la actividad catalítica de la GSK3 β . Este efecto antiapoptótico de la inhibición de esta enzima en las neuronas granulares, se comprobó igualmente que la acción de inhibidores selectivos de la GSK3 protegían frente a este tipo de apoptosis (Chin y cols., 2005).

La GSK3 participa también en la apoptosis o la protección inducida por otros múltiples factores en las neuronas granulares de cerebelo, como la señalización proapoptótica mediada por ceramidas (Mora y cols., 2002) o la privación de factores tróficos en cultivo (Hetman y cols., 2000).

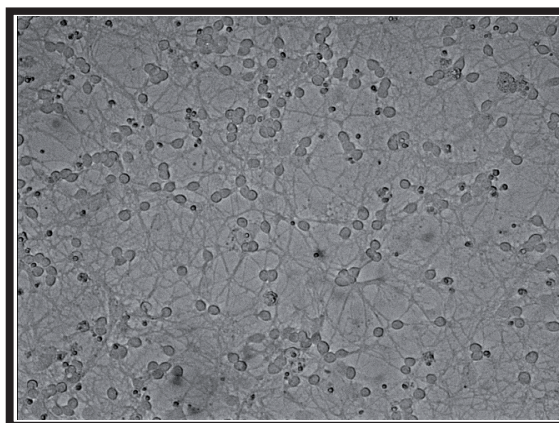


Figura 13.- Neuronas granulares de cerebelo en cultivo. La imagen tomada con un objetivo 20X de contraste de fases muestra neuronas granulares en día 11 de cultivo, destacándose la compleja red de prolongaciones axodendríticas establecida entre los somas neuronales, así como la pureza de este tipo de cultivo celular, superior al 95%.

En lo referente a la apoptosis neuronal una de las principales vías de supervivencia, que es activada por la señalización de numerosos factores de crecimiento como el IGF-I o el GDF-15, esta mediada por la PI3K que a su vez activa a la proteína Akt. Estas dos proteínas fosforilan e igualmente inactivan a la GSK3, como veremos en el apartado siguiente. (Cross y cols., 1995) (Subramaniam y cols., 2003). Esta misma vía de señalización está relacionada por la protección que el NMDA ejerce sobre las neuronas granulares de cerebelo en cultivo durante su desarrollo (Zhang y cols., 1998) (Zhu y cols., 2005) (Xifro y cols., 2005) o en la prevención de la apoptosis inducida por la activación de la quinasa dependiente de calcio calmodulina IV (See y cols., 2001). La actividad de la PI3K y de las ERK resulta necesaria, igualmente, para la inhibición de la GSK3 y el mantenimiento de la supervivencia neuronal inducida por el factor BDNF, en neuronas corticales (Hetman y cols., 2002) o en precursores neurales (Lim y cols., 2008) y colaboran en la protección que ejerce el NMDA en las neuronas granulares de cerebelo (Zhu y cols., 2005). Por último la GSK3 promueve la actividad de la GSK3 de miembros proapoptóticos, como Bax (Linseman y cols., 2004) de la familia de Bcl-2, que es vital en la regulación de la apoptosis neuronal (Merry y Korsmeyer, 1997).

Todos estos datos nos impulsaron al estudio del posible papel de esta enzima en la señalización mediada por los receptores de nucleótidos en las neuronas granulares de cerebelo, debido al importantísimo número de sustratos que posee, el amplio sistema de regulación sobre ella y el gran número de acciones en las que está involucrada en el sistema nervioso, como veremos en mayor detalle, en el apartado siguiente.

3.- GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK3).

3.1.- Introducción general.

La enzima Glucógeno Sintasa Quinasa 3, originalmente nombrada así debido a su papel central en el metabolismo del glucógeno, es una serina proteína quinasa con funciones clave en multitud de procesos. Constituye una etapa central en muchas vías de señalización y regula importantes efectos a nivel celular. Entre ellos, destaca su importancia dentro de los sistemas de señalización acoplados a factores de crecimiento como la insulina, y su participación dentro de la vía de Wnt, esencial para el desarrollo embrionario, además de su papel regulador en la síntesis proteica, la proliferación, diferenciación, motilidad celular, dinámica de microtúbulos y apoptosis. Igualmente está implicada en el correcto funcionamiento a nivel cognitivo del organismo. Todas estas funciones se basan en el gran número de sustratos que es capaz de regular la GSK3, de los que hasta la fecha se han identificado más de 40, entre los que se encuentran factores de iniciación, elementos del ciclo celular, factores de transcripción y proteínas implicadas en la dinámica de los microtúbulos y adhesión celular, sin olvidar por supuesto, las que participan en la regulación del metabolismo. Estas importantes funciones reguladoras de la GSK3 llevan asociado el hecho de que sus alteraciones se encuentren unidas a

varias situaciones patológicas. (Jope y Johnson, 2004) (Frame y Cohen, 2001) (Grimes y Jope, 2001).

La GSK3 fue descubierta en 1980 e identificada como una de las proteínas quinasas capaces de actuar sobre la glucógeno sintasa, enzima clave en el metabolismo que regula el paso final de la biosíntesis de glucógeno y que resultaba fosforilada e inactivada por la acción de la GSK3 (Embi y cols., 1980). Purificada a partir del músculo esquelético de conejo (Rylatt y cols., 1980), se identificaron en mamíferos dos isoformas, muy relacionadas, la GSK3 α y la GSK3 β (Woodgett, 1990), a las que más recientemente se uniría la isoforma resultante del procesamiento alternativo de la GSK3 β , la GSK3 β 2 (Mukai y cols., 2002). La GSK3 α y β están codificadas por genes diferentes y poseen unas secuencias casi idénticas en sus dominios catalíticos (97%) situados en la zona central, mientras que fuera de estos dominios las secuencias difieren notablemente. La isoforma α posee un peso molecular de 51 KDa, mientras que la isoforma β cuenta con un peso molecular de 47 KDa y una secuencia compuesta por 482 aminoácidos, siendo la homología total de aminoácidos entre ambas de un 85% (Jope y Johnson, 2004) (Embi y cols., 1980) (Woodgett, 1991). En cuanto a la variante de la isoforma β , la GSK3 β 2 cuenta con un inserto de 13 aminoácidos en su dominio catalítico consecuencia del procesamiento alternativo (Mukai y cols., 2002).

Aunque fuera aislada en el músculo esquelético, la GSK3 se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos con niveles particularmente altos en el cerebro (Woodgett, 1990), especialmente la isoforma GSK3 β . Esta isoforma muestra niveles muy elevados durante el desarrollo, decreciendo posteriormente a partir del día 20 tras el nacimiento, y participando en la formación de sinapsis, migración celular, polarización y desarrollo de neuritas (Leroy y Brion, 1999) (Shi y cols., 2004). En cuanto a su actividad enzimática una gran parte de sus sustratos requieren de una fosforilación previa, por parte de otra quinasa, para ser reconocidos por la GSK3 (DePaoli-Roach, 1984) (Fiol y cols., 1988). Esta fosforilación previa se realiza en $n+4$, (siendo n el residuo a fosforilar por la GSK3), dando lugar a un orden “jerárquico” de fosforilaciones. Esto sucede en sustratos como por ejemplo, la glucógeno sintasa, la ATP-citrato-lasa, el factor de iniciación eIF2B etc. (Fiol y cols., 1987) (Hughes y cols., 1992) (Benjamin y cols., 1994). El reconocimiento e interacción con el sustrato pre-fosforilado, se lleva a cabo a través de los residuos de Arginina 96, 180, o la Lisina 205, situados en el dominio catalítico de actividad quinasa de la GSK3 (Frame y cols., 2001). Estos residuos de reconocimiento se encuentran conservados en todos los homólogos de la GSK3 identificados hasta la fecha (Kim y Kimmel, 2000). Sin embargo la fosforilación previa no es un paso imprescindible para que la GSK3 actúe, ya que hay sustratos que contienen una gran variedad de residuos ácidos que son reconocidos por la GSK3 sin necesidad de este prerequisite (Fiol y cols., 1988).

3.2.- Mecanismos de regulación de la GSK3

Dada la importancia de la GSK3 debido a la gran variedad de los procesos que están directa o indirectamente relacionados con su actividad, esta enzima se encuentra amplia y específicamente regulada en el interior celular. Entre los sistemas de regulación más importantes se sitúan, sin duda, las fosforilaciones (pudiendo ser estas inhibidoras o facilitadoras de la actividad enzimática), aunque también se regula por defosforilaciones activadoras, por formación de complejos proteicos, y por la actuación de inhibidores selectivos como los fármacos para el tratamiento del trastorno bipolar y otros compuestos.

3.2.1.- Regulación por fosforilación.

Regulación de la GSK3 por fosforilaciones inhibitorias de su actividad. Fosforilación en sus residuos de Serina.

Las fosforilaciones en los residuos de serina 21 y 9 en el extremo N-terminal para las isoformas α y β respectivamente, llevan asociadas la disminución de la actividad catalítica de la GSK3 (Plyte y cols., 1992). Estas fosforilaciones parecen actuar a modo de pseudo-sustrato intramolecular, que bloquea el acceso al sitio catalítico de los sustratos pefosforilados (Doble y Woodgett, 2003). Existen numerosas quinasas activadas por distintas vías de señalización capaces de realizar esta fosforilación. Entre ellas destacan la Akt/PKB, ciertas isoformas de la PKC, la PKA, la p70S6 quinasa y la p90RsK (también llamada MAPKAP quinasa-1).

La Akt es la principal enzima activada por la vía de señalización de la insulina, involucrada en la fosforilación en serina de la GSK-3. La activación de los receptores de insulina inicia una cascada de señalización que culmina en la fosforilación, de manera dependiente de la PI3K, de los residuos Ser 473 y Thr 308 de la Akt. Estas fosforilaciones activan la enzima y permiten que ésta, a su vez, fosforile a la GSK3 por medio de interacción directa entre las dos proteínas (Delcommenne y cols., 1998) (Alessi y cols., 1996) (van Weeren y cols., 1998). La inhibición de la GSK-3 por parte de la insulina disminuye los niveles de fosforilación de la glucógeno sintasa, que resulta activada. Esta defosforilación se ve también reforzada por la activación de la proteína-fosfatasa 1 (Cohen y cols., 1978) (Newgard y cols., 2000). Además de la insulina, numerosos factores de crecimiento son capaces de inactivar la GSK3 a través de la vía de señalización dependiente de la PI3K/Akt, como es el caso del IGF-I, BDNF, FGF-1, en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, neuronas corticales, células HT22 (Quevedo y cols., 2000) (Cui y cols., 1998) (Bhave y cols., 1999) (Hashimoto y cols., 2002) y en hepatocitos (Park y cols., 1999), el NGF (factor de crecimiento nervioso) en células PC12 (Pap y Cooper, 1998), y el EGF (factor de crecimiento endotelial) en células musculares (Halse y cols., 1999).

La vía PI3K/Akt también regula la actividad de la GSK3 como respuesta al estrés celular derivado del estrés oxidativo, y las proteínas de shock térmico inducen, de esta forma,

la inactivación de la GSK3 (Shaw y cols., 1998) (Lin y cols., 1997) (Blair y cols., 1999). Todos estos casos convierten, en conjunto, a la vía de la Pi3K/Akt en la vía principal de inhibición de la actividad catalítica de la GSK3 a través de la fosforilación en sus residuos de serina.

Además de la Akt, la p90RSK, también llamada MAPKAP quinasa-1, y la p70S6 quinasa (p70S6K) son otras dos enzimas capaces de fosforilar los residuos de serina de la GSK3 disminuyendo su actividad catalítica. La implicación de estas dos enzimas en esta vía fue descrita ya en 1993 y 1994 (Sutherland y cols., 1993) (Sutherland y Cohen, 1994), siendo su actividad sensible a la acción de la fosfatasa 2A. Por su parte, la p90RSK está implicada en la fosforilación de la GSK3 β en respuesta a las vías de señalización activadas por EGF en células A431 humanas y en células NIH3T3 (Saito y cols., 1994) (Eldar-Finkelman y cols., 1995), por ésteres de forbol en células S3T3 (Shaw y Cohen, 1999), y por esteroides cardiotónicos en tejido muscular esquelético de humano y rata (Kotova y cols., 2006a) (Kotova y cols., 2006b).

Por último, la quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y ciertas isoformas de la familia de las proteína quinasas C (PKC) (α , β I, β II, γ , no la ϵ) son también capaces de incrementar los niveles de fosforilación inhibitoria de la GSK3 (Fang y cols., 2000) (Li y cols., 2000) (Goode y cols., 1992). La PKA es la responsable de la inhibición de la GSK3 en la señalización activada por endotelina-1 en la hipertrofia de las células vasculares del músculo liso (Taurin y cols., 2007). Con respecto a la PKC, su participación ha sido descrita en la inhibición de la GSK3 por la vía de Wnt/Wingless (Cook y cols., 1996). De igual forma, la acción de la isoforma PKCzeta,

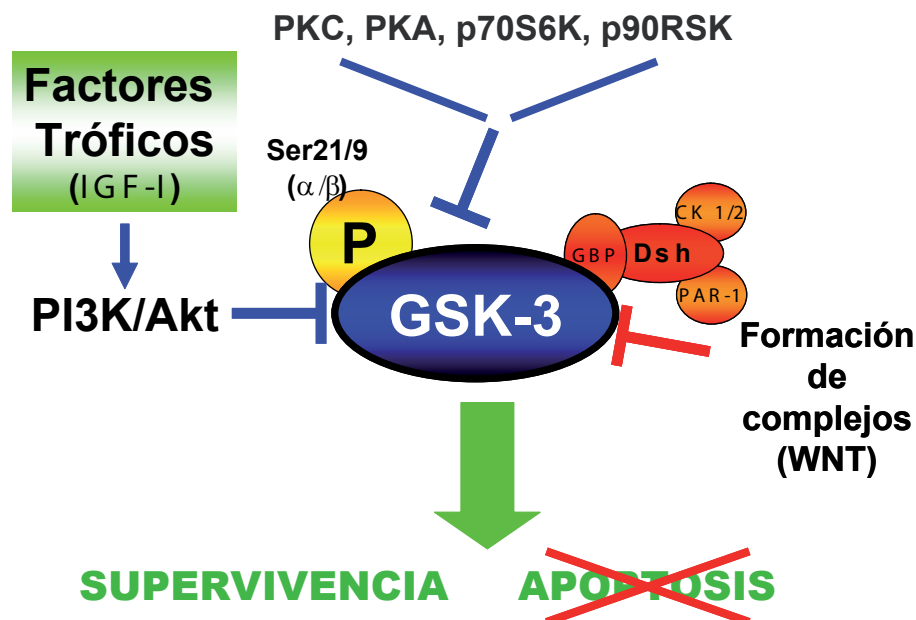


Figura 14.- Principales mecanismos de inhibición de la GSK3. La regulación de la actividad de la GSK3 es un paso clave en el equilibrio apoptosis/supervivencia neuronal. En este sentido la principal vía de supervivencia es la activada por los factores tróficos, que a través de la vía de la PI3K/Akt, fosforilan a la GSK3 inactivándola. Otras quinasas pueden fosforilar a la GSK3 en este mismo sentido, como la PKA, la PKC, la p90RSK o la P70S6K. La actividad de la GSK3 puede regularse también por la formación de complejos proteicos como los activados por medio de la vía de señalización de Wnt.

junto con la Akt, inhiben GSK3 en la vía activada por insulina en células L6hIR (Oriente y cols., 2001). Además, la proteólisis parcial, asociada a la apoptosis, que se produce sobre la isoforma PKC ζ , genera un fragmento activo capaz de fosforilar e inactivar la GSK3 (Tsujio y cols., 2000).

Regulación de la GSK3 por fosforilaciones facilitadoras de su actividad. Fosforilación en los residuos de Tirosina.

A diferencia de las fosforilaciones en los residuos de serina, las fosforilaciones que la GSK3 experimenta en sus residuos de tirosina 279/216, para las isoformas α y β respectivamente, parecen incrementar su actividad enzimática (Hughes y cols., 1993) (Wang y cols., 1994). Esta fosforilación permite la relocalización del residuo en la estructura de la GSK3 interaccionando con una arginina próxima e incrementando el acceso de los sustratos y la actividad quinasa (Cole y cols., 2004). La defosforilación de estos residuos reduce la actividad de la enzima (Hughes y cols., 1993) como se observa cuando se produce la activación directa de la PKC en determinados tipos celulares (Murai y cols., 1996). Se ha descrito que los factores de crecimiento no varían la fosforilación en los residuos de tirosina (Shaw y cols., 1997), aunque existen evidencias de reducción de los niveles de esta fosforilación en tratamientos con insulina, EGF (Murai y cols., 1996), frente a estímulos proapoptóticos, como daño celular, privación de NGF o tratamiento con estaurosporina (Bhat y cols., 2000).

Al igual que en el caso de los residuos de serina, la fosforilación de los residuos de tirosina está ampliamente regulada por las vías de señalización intracelular. En este sentido, el ácido lisofosfatídico induce, a través de las proteínas $G\alpha_{12/13}$, la activación de la GSK3 por fosforilación en sus residuos de tirosina en células N2A (Sayas y cols., 2002). Se conocen diferentes quinasas capaces de fosforilar estos residuos, como es el caso de la tirosina quinasa ZAK-1 en Dictyostelium (Kim y cols., 1999), o la quinasa Fyn de la familia de las Src tirosina quinasas (Lesort y cols., 1999). De igual modo ha sido descrito que los incrementos transitorios de la concentración intracelular de calcio incrementan los niveles de fosforilación en tirosina de la GSK3 (Hartigan y Johnson, 1999).

Regulación por defosforilaciones activadoras de la GSK3.

La regulación de la enzima GSK3 por medio de vías de señalización que llevarían a la defosforilación de los residuos de serina y por lo tanto, a su activación y aumento de actividad catalítica, es un hecho descrito cada vez más frecuentemente en la bibliografía. Esta fosforilación ocurre cuando se produce la inhibición de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5) que, a su vez, mantiene inactiva a la proteína fosfatasa 1, PP1. El consiguiente aumento de la actividad de la PP1 defosforila los residuos de serina de la GSK3, activándola y permitiendo que actúe sobre el transporte de proteínas a la membrana axonal (Morfini y cols., 2004). La PP1 es también la

responsable de la activación de la GSK3, CDK5 y CDK2 en prosencéfalo, incrementando la fosforilación de Tau llevada a cabo por estas enzimas (Bennecib y cols., 2000). De igual forma, la defosforilación y activación de la GSK3 mediada por la proteína fosfatasa 2A, (PP2A) en neuronas granulares de cerebelo, conduce a la apoptosis en la señalización activada por C_2 -Ceramida (Mora y cols., 2002). Asimismo, la vía de señalización acoplada al AMP influye positivamente en la regulación de la GSK3. La activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), sensor celular de la falta de aporte energético a las células, provoca en los cultivos de neuronas hipocámpales y en células de neuroblastoma SH-SY5Y, la defosforilación de Akt y, como consecuencia de esto, la defosforilación de los residuos de serina de GSK3 y el aumento de su actividad catalítica (King y cols., 2006).

3.2.2.- Regulación de la GSK3 por formación de complejos proteicos.

La GSK3 no se regula únicamente por variaciones en la fosforilación de sus residuos, sino que también está altamente regulada por la interacción directa con otras proteínas, a través de la formación de complejos proteicos.

Vía de Wnt.

Sin duda, la ruta de regulación de la actividad de la GSK3 por medio de formación de complejos proteicos más conocida es la de la vía de Wnt, donde la GSK3 interviene tanto en la vía canónica como no canónica. El término Wnt fue acuñado como combinación de *wg* (*wingless*) y de *int* y se puede pronunciar como 'wint'. El gen *wingless* había sido identificado originalmente como un gen que controlaba la polaridad de los segmentos en *Drosophila melanogaster*, que se expresa durante la embriogénesis y también en el adulto durante la metamorfosis. Los genes *int* fueron inicialmente identificados como genes relacionados con los sitios de inserción de virus generadores de tumores en vertebrados. Ambos genes son homólogos y comparten un origen evolutivo. En la vía canónica de Wnt, altamente conservada a lo largo de la evolución, la GSK3 participa en el control del regulador transcripcional β -catenina.

En ausencia de estimulación de Wnt, la β -catenina se encuentra básicamente localizada en membrana asociada a componentes del citoesqueleto, como las cadherinas, y regulando la dinámica de la actina y de las adhesiones celulares. Los niveles de β -catenina en citosol en estas circunstancias son bajos debido a la regulación negativa que ejerce el complejo multimérico en el que se encuentra la propia β -catenina con la GSK3, Axina, Caseína Kinasa I (CK1), Axina 2/Axil /conductina y APC (adenomatus poliposis coli gene product) (Hart y cols., 1998; Amit y cols., 2002; Liu y cols., 2002). Dentro de este complejo, la caseína kinasa I fosforila a la β -catenina en su residuo Ser45, haciéndola reconocible para la GSK3, que la fosforila en Thr41, Ser37 y Ser33 (Jope y Johnson, 2004). La GSK3 también fosforila en el interior del complejo tanto a la axina como al APC. Estas fosforilaciones actúan en sentido contrario a las realizadas sobre la β -catenina, estabilizando de esta forma a la Axina, y propiciando la interacción de la

APC con la β -catenina (Rubinfeld y cols., 1996) (Kishida y cols., 1998) (Hedgepeth y cols., 1999). La acción de APC junto con la de la proteína F-box, β TrCP, median la destrucción, vía proteasoma, de la β -catenina polifosforilada de esta forma (Moon y cols., 2002) (Hart y cols., 1999; Kitagawa y cols., 1999).

Cuando se produce la llegada de la señal de Wnt, ésta es reconocida por los receptores de 7 segmentos transmembrana Frizzled (Bhanot y cols., 1996) (Yang-Snyder y cols., 1996) y los LDL receptor related proteins (LRP 5/6) (Wehrli y cols., 2000) (Tamai y cols., 2000) (Pinson y cols., 2000), que actúan como correceptores. La activación de Frizzled lleva a la activación, mediada por ciertas subunidades de las proteínas G (Katanaev y cols., 2005) (Liu y cols., 2001), de la proteína Disheveled. Esta proteína interacciona con las GBP (proteínas de unión a GSK3), que en mamíferos están representadas por las isoformas, Frat 1, 2 y 3 (Jonkers y cols., 1997) (Li y cols., 1999; Thomas y cols., 1999) (van Amerongen y cols., 2004), e inhiben la GSK3 por la ruptura de su complejo con la Axina. La Axina y Frat compiten por la unión a GSK3 (Farr y cols., 2000), mientras que Disheveled puede unirse tanto a Axina como a Frat 1, y facilita la disociación de la Axina de GSK3 y la unión a esta última de Frat 1, reduciéndose la actividad quinasa de la GSK3 y favoreciendo la estabilización y acumulación de la β -catenina en el citosol (Krylova y cols., 2000) (Li y cols., 1999), lo que lleva a su translocación al núcleo donde actúa como regulador transcripcional de genes activados por el factor de transcripción TCF/Lef-1.

Hedgehog.

Otro ejemplo de complejo proteico es el formado por la GSK3 con Hedgehog, familia de proteínas secretadas que regulan procesos de crecimiento y desarrollo a través de GSK3 y cuyas alteraciones están relacionadas con defectos neurales y procesos tumorales. Hedgehog y Wnt no suelen coincidir en poblaciones celulares, ya que sus mecanismos son bastante paralelos. Cuando Hedgehog no está presente, la GSK3 forma complejos con el factor de transcripción Ci-155 y con otras proteínas como Fused, PKA, Cos2 y CK1. En el interior de este complejo, PKA fosforila a Ci-155 en varios residuos, haciéndolo reconocible para GSK3 y CK1 que a su vez hiperfosforilan al factor de transcripción induciendo su degradación vía proteasoma, convirtiéndose en el fragmento Ci-75 que actúa como represor transcripcional. (Jia y cols., 2002; Price y Kalderon, 2002) (Lefers y Holmgren, 2002). Cuando Hedgehog se une a Patched (Proteína de 12 segmentos transmembrana que se identifica con el receptor de Hedgehog), se produce la hiperfosforilación y liberación de Smoothened (SMO), que a su vez se une a Cos2, disgregando el complejo e inhibiendo la fosforilación de Ci y su posterior proteolisis, y facilitándose finalmente la expresión de los genes regulados por Hedgehog. (Cohen, 2003) (Zhang y cols., 2005) (Jia y cols., 2003; Lum y cols., 2003; Ruel y cols., 2003) (Apionishev y cols., 2005).

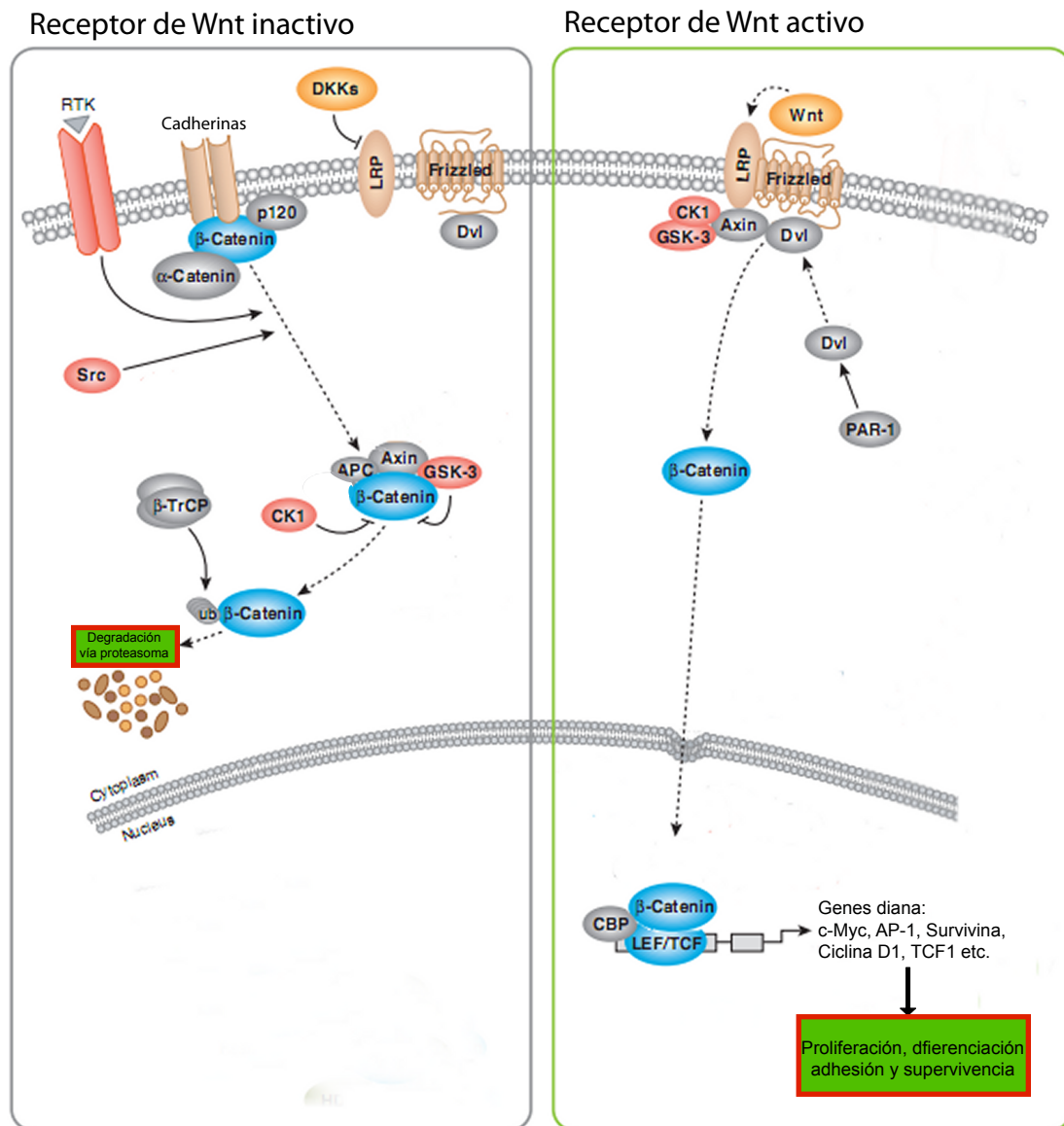


Figura 15.- Esquema de la vía de señalización de Wnt. En ausencia de estimulación de Wnt, la β -catenina se encuentra básicamente localizada en membrana asociada a componentes del citoesqueleto, como las cadherinas. Los niveles de β -catenina en citosol en estas circunstancias son bajos debido a la regulación negativa que ejerce el complejo multimérico en el que se encuentra la propia β -catenina con la GSK3, Axina, Caseína Kinasa I (CK1), Axina 2/Axin /conductina y APC. Dentro de este complejo, la β -catenina resulta fosforilada por la GSK3 lo que conduce a su ubiquitinización mediada por la proteína F-box, β TrCP, y su degradación vía proteasoma. La llegada de la señal de Wnt, lleva a la activación, mediada por proteínas G, de la proteína Dishevelled que interacciona con las GBP facilitando la disociación de la β -catenina del complejo, su estabilización y acumulación en el citosol y su translocación al núcleo donde actúa como regulador transcripcional de genes activados por el factor de transcripción TCF/Lef-1. Esquema modificado del original de cell signaling.

Presenilina.

La GSK3 también está formando complejos con la Presenilina (PS), enzima que interviene en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Los péptidos A β se generan por rupturas secuenciales de APP, la primera ruptura elimina su dominio extracelular y permite rupturas sucesivas mediadas por la γ secretasa. La presenilina posee dominios de unión tanto para GSK3 como para β -catenina, habiéndose demostrado la formación de complejos entre GSK3, PS y la γ secretasa, y participando en el procesamiento de APP (Czech y cols., 2000; Phiel y cols., 2003). La inhibición de la GSK3 reduce, en este caso, el procesamiento de APP y la acumulación de los péptidos A β . También se ha propuesto la formación de complejos de PS con GSK3, PKA y β -catenina, donde la PS funcionaría análogamente a la Axina, actuando como un regulador negativo de la vía de Wnt (Kang y cols., 1999; Gantier y cols., 2000; Kang y cols., 2002).

Complejo Par, estradiol y complejos reguladores de la localización celular de GSK3.

GSK3 también interacciona con las proteínas del complejo Par, heterotrímero formado por Par 6, Par 3 y PKC ζ , regulando la polaridad neuronal. Este complejo regula la especificidad apical/basolateral, el desarrollo axonal y las migraciones de ciertas clases celulares. Este complejo se asocia a la GTPasa Cdc42 que promueve la activación de PKC ζ , que a su vez fosforila la GSK3 en serina, inactivándola para regular la migración celular y la polarización. La inhibición de Cdc42 o PKC inhibe tanto la fosforilación de la GSK3 como la orientación de los microtúbulos y la migración en astrositos (Brajenovic y cols., 2004) (Etienne-Manneville y Hall, 2003b) (Etienne-Manneville y Hall, 2003a) (Shi y cols., 2004).

La actividad de la GSK3 resulta igualmente regulada por el estradiol a través de complejos proteicos. La GSK3 se asocia con el receptor de estrógenos α , y con β -catenina. En presencia de la hormona se produce la fosforilación de la GSK3 en serina y la liberación de β -catenina del complejo. El estradiol también regula el complejo en el que intervienen GSK3, Tau, la subunidad reguladora p85 de la PI3K y la β -catenina. El estradiol aumenta los niveles de p85 y β -catenina asociados a Tau, mientras que disminuye la presencia de GSK3 β (Cardona-Gomez y cols., 2004).

Por último, los complejos proteicos no solamente regulan la actividad de la GSK3, sino que también influyen en su localización celular, como es el caso de los complejos de unión de GSK3 a Frat-1 que facilita su salida del núcleo. Además, en el núcleo se encuentran presentes proteínas como la Axina o Dishevelled, lo que sugiere una regulación a nivel nuclear de la GSK3 (Franca-Koh y cols., 2002). La GSK3 interacciona de forma directa en el núcleo con p53, promoviéndose la actividad transcripcional de éste y sus acciones proapoptóticas (Watcharasit y cols., 2002). Igualmente p53 y GSK3 se unen en la mitocondria, facilitando la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas (Watcharasit y cols., 2003).

3.2.3.- Regulación de la GSK3 por fármacos para el tratamiento del trastorno bipolar o por inhibidores específicos.

Inhibidores selectivos como el SB-216763 (Cross y cols., 2001), el AR-A0144148 (Bhat y cols., 2003) o el litio (Klein y Melton, 1996) regulan la actividad de la GSK3 habiéndose descrito hasta la fecha más de 30 inhibidores de esta quinasa (Meijer y cols., 2004). El litio inhibe la GSK3 por dos mecanismos, uno directo y rápido, en el que compite con el Mg^{2+} , y otro indirecto y más lento, que opera mediante el aumento de la fosforilación de los respectivos sitios inhibidores de Ser, tanto para la GSK-3 β , como para la GSK-3 α (Ser 9 y Ser21, respectivamente) (Amari y cols., 1999) (Phiel y Klein, 2001). Los otros dos inhibidores actúan de manera competitiva por el sitio de unión del ATP. La inhibición de la actividad catalítica de la GSK3 por parte del SB-216763, del AR-A0144148 y del litio, ha sido demostrada observando la reducción de los niveles de fosforilación de Tau (Cross y cols., 2001) (Klein y Melton, 1996) (Bhat y cols., 2003). El SB216763, y el litio también estabilizan los niveles citosólicos de la β -catenina (Stambolic y cols., 1996) (Cross y cols., 2001). Por último, el tratamiento con litio produce la inhibición de la GSK3 y la desestabilización y reducción de los niveles de Axina (Yamamoto y cols., 1999).

3.3.- Sustratos regulados por la GSK3.

La GSK3 fosforila numerosos sustratos entre proteínas de metabolismo y señalización, proteínas estructurales y factores de transcripción. Hasta la fecha se conocen más de 40 sustratos de esta enzima, algunos de los cuáles detallamos en la siguiente tabla, junto con los efectos principales ejercidos sobre ellos por la GSK3.

Proteínas de membrana y señalización	
Sustrato	Efecto
Glucogeno sintasa	Su inhibición por parte de la GSK3 activa la síntesis de glucogeno
Subunidad reguladora de PKA	Incremento de su capacidad inhibitoria sobre la subunidad catalítica.
Inhibidor-2 PPA	Activación de la PPA-1
Proteína básica de mielina	Posible regulación de la fosforilación/defosforilación cíclica de la mielina en el sistema nervioso central
Receptor de Glucocorticoides	Regulación de la actividad transcripcional dependiente de estos receptores
IRS 1	Atenuación de la vía activada por insulina
Ciclina D1	Variación de su localización intracelular
Precursor b-amiloide	Incrementa la maduración de la proteína precursora
Factor 2B de iniciación eucariótica	Bloqueo de su actividad
APC y Axina	Estabilización del complejo proteico
Proteínas estructurales	
Sustrato	Efecto
Proteínas asociadas a microtúbulos: MAP1B, MAP2 y Tau	Alteración de la capacidad de estas proteínas de interaccionar con los microtubulos, y por lo tanto de la estabilidad del citoesqueleto.
β -catenina y MUC1	Regulación de la adhesión celular
Kinesinas (cadenas ligeras)	Reducción de la movilidad en el transporte axonal
proteína básica de mielina	Posible regulación de la fosforilación/defosforilación cíclica de la mielina en el sistema nervioso central
Nineína Humana	
Proteínas del neurofilamento	

Factores de transcripción	
Sustrato	Efecto
AP-1(Familia Jun, Fos, ATF)	Reducción de su actividad y como consecuencia de la proliferación y muerte celular
Myc	Regulación de crecimiento diferenciación y transformación celular.
CREB	Expresión de genes con promotores con elementos de respuesta al AMPc, memoria a largo plazo, plasticidad sináptica y apoptosis
HSF-1	Regulación de la defensa frente a estrés celular y expresión de proteínas de choque térmico
NFAT	Desarrollo timo, respuesta inmune, morfogénesis cardíaca y supervivencia neuronal
β-catenina	Regulación de la actividad transcripcional de factores TCF/Lef sobre genes implicados en el ciclo celular, adhesión, desarrollo, supervivencia etc.
C/EBP	Regulación de el metabolismo de nutrientes en hígado, diferenciación de adipocitos y de genes relacionados con la señalización neuronal
NFκB	Activación de genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria, y con la activación neuronal y supervivencia
Nrf2	Implicados en la homeostasis redox, regulación de la expresiones de genes como la hemooxigenasa-1 o NADPH.

3.4.- GSK3 y apoptosis.

La regulación de la muerte celular por medio de la apoptosis es un elemento clave en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los organismos pluricelulares. Las alteraciones de la regulación de la apoptosis están relacionadas con la aparición de procesos patológicos, ya sea por apoptosis deficiente, como en el caso del cáncer o enfermedades autoinmunes, como por exceso de apoptosis, como en el caso de las enfermedades neurodegenerativas. La GSK3 es una de las pocas enzimas capaces de actuar en ambas direcciones, tanto incrementando como reduciendo la sensibilidad de la célula a la apoptosis. Esto se debe a que, por un lado, la GSK3 estimula la vía intrínseca de la apoptosis, mediada por la activación de las caspasas a través de las proteínas liberadas desde interior mitocondrial, ya que la GSK3 regula la actividad de factores de transcripción implicados en la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos. Por otro lado, la GSK3 inhibe la vía extrínseca de apoptosis mediada por los denominados “receptores de muerte”, a través de la regulación de NF κ B y del bloqueo de la activación de las caspasas implicadas en esta forma de apoptosis (Beurel y Jope, 2006).

3.4.1.- Potenciación de la vía intrínseca mitocondrial de apoptosis por la GSK3.

La GSK3 ha sido identificada como la responsable de amplificar el efecto de numerosos estímulos que activan la vía intrínseca de apoptosis mediada por la mitocondria. Esta vía de apoptosis, se desencadena frente a distintos tipos de estímulos, como la inhibición de la PI3K/Akt o la deprivación de la señalización activada por los factores tróficos (Ortega y cols., 2008) (Chin y cols., 2005), el daño en el DNA (Beurel y cols., 2004) (Tan y cols., 2006), las toxinas mitocondriales (King y Jope, 2005), situaciones de hipoxia/isquemia (Roh y cols., 2005), excitotoxicidad mediada por glutamato (Rojo y cols., 2008) (Goodenough y cols., 2004), apoptosis inducida por el factor de activación plaquetario (Tong y cols., 2001), estrés hipertónico (Rao y cols., 2004), exposición a ceramidas (Mora y cols., 2002), etanol (Takadera y Ohyashiki, 2004), shock térmico (Bijur y cols., 2000), estaurosporina (Bijur y cols., 2000) y estrés oxidativo (Shin y cols., 2004). Todos estos datos revelan la participación de la GSK3 en la regulación de numerosos elementos implicados en esta vía apoptótica, ya que su inhibición por sí sola protege frente a varios de estos estímulos proapoptóticos.

Dentro de los componentes regulados por la GSK3 que participan directamente en la vía mitocondrial de la apoptosis, destacan los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bim. Por un lado, la GSK3 es capaz de fosforilar a Bax en Ser163, lo que permite su activación (Linseman y cols., 2004), el desarrollo de su acción secuestradora e inhibidora sobre las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bcl-2 y Bcl-x_L (Martinou y Green, 2001) y su interacción con la membrana mitocondrial. Esta interacción facilita la liberación de las proteínas mitocondriales inductoras de apoptosis dependientes de caspasas, como el citocromo c, Smac/DIABLO, así como proteínas independientes de la activación de caspasas, como AIF (factor inductor de apoptosis) y la endonucleasa G (Armstrong, 2006). Por otro lado, la GSK3 facilita la expresión de Bim activada por estrés (Hongisto y cols., 2003).

Además la GSK3 facilita la activación de esta vía intrínseca de apoptosis actuando sobre determinados factores de transcripción. La GSK3 β aumenta drásticamente su actividad en el interior del núcleo celular durante la apoptosis, promoviendo la actividad de p53 e induciendo la expresión de Bax como respuesta al daño por DNA (Tan y cols., 2005). Asimismo, la GSK3 es capaz de inhibir al factor de transcripción CREB, bloqueando la expresión de Bcl-2 dependiente de este factor (Lonze y Ginty, 2002). Estas dos proteínas son claves en el mantenimiento de la integridad mitocondrial, y las variaciones de expresión ejercidas por la GSK3 inclinan claramente la balanza a favor de los estímulos proapoptóticos.

Más allá de su acción directa sobre la mitocondria, la GSK3 puede facilitar la apoptosis a través de otros sustratos regulados por su actividad catalítica. Esta enzima es capaz de actuar

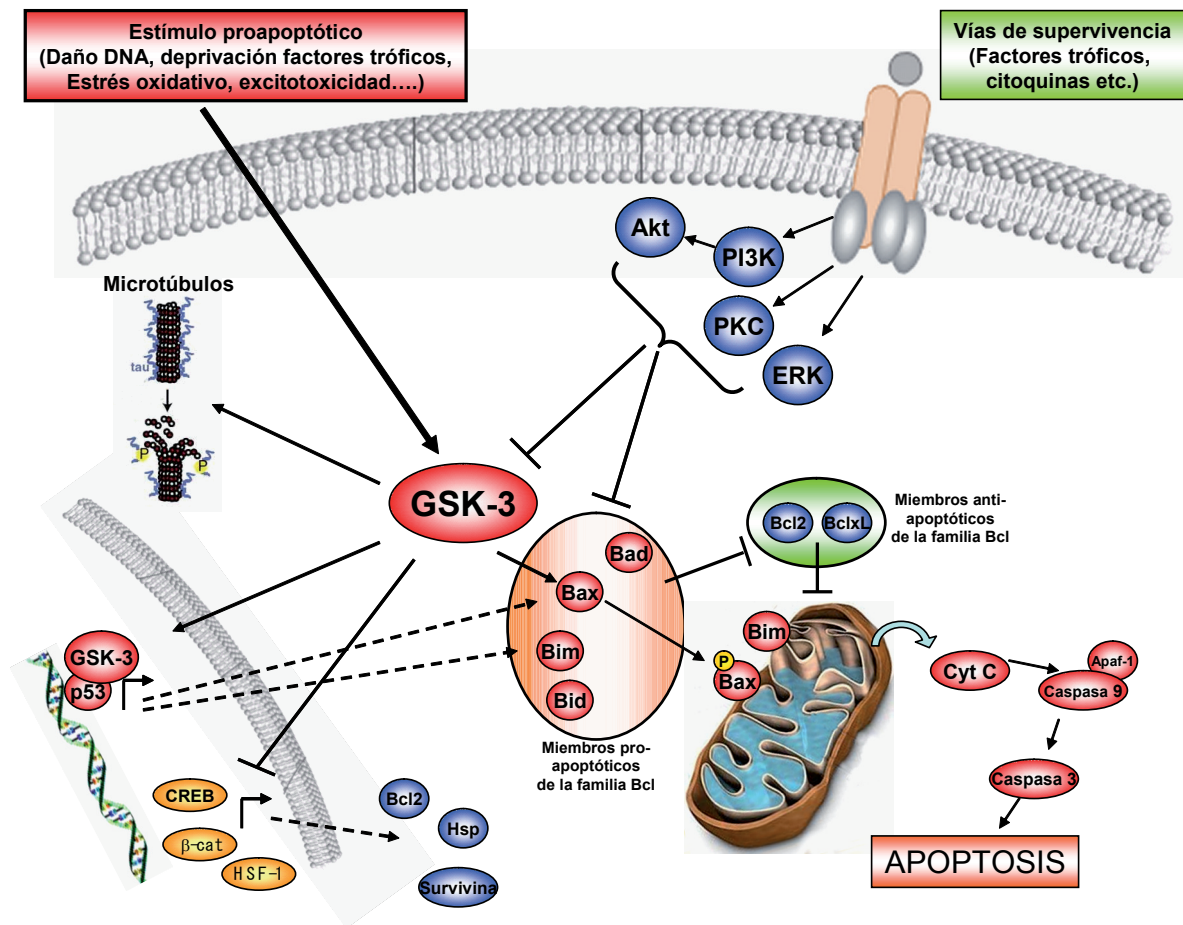


Figura 16.- Papel de la GSK3 en la potenciación de la vía intrínseca de apoptosis. La GSK3 promueve la vía intrínseca por medio de la fosforilación de Bax en Ser163, lo que permite su activación, el desarrollo de su acción secuestradora e inhibidora sobre las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bcl-2 y Bcl-x_L y su interacción con la membrana mitocondrial. Esta interacción facilita la liberación de las proteínas mitocondriales inductoras de apoptosis dependientes de caspasas, como el citocromo c. Además la GSK3 β interacciona con p53 promoviendo su actividad e induciendo la expresión de Bax y Bim, e inhibe factores de transcripción como HSF-1, CREB o β -catenina bloqueando la expresión de elementos antiapoptóticos. Por último, la GSK3 puede facilitar la apoptosis actuando sobre proteínas que regulan la estructura celular, como Tau.

sobre proteínas que regulan la estructura celular y cuya desestabilización puede contribuir a la apoptosis. Este es el caso de la proteína Tau, cuya fosforilación dependiente de GSK3 facilita su disociación de los microtúbulos y la desestabilización de éstos últimos (Jope y Johnson, 2004). La hiperfosforilación de Tau mediada por GSK3, puede llevar a la formación de los ovillos neurofibrilares que resultan por sí mismos tóxicos para la célula (Avila y cols., 2004). De forma parecida, la fosforilación que la GSK3 lleva a cabo sobre la kinesina puede desestabilizar el transporte intracelular y contribuir a la apoptosis (Morfini y cols., 2002).

Además del efecto sobre las proteínas estructurales, la GSK3 fosforila, inhibe o facilita la degradación de varios factores de transcripción que inducen la expresión de genes que

favorecen la supervivencia celular. Este es el caso de la β -catenina que inhibe la apoptosis vía Wnt (Polakis, 1999), a través de la regulación de la expresión de genes como Bcl-2 o la survivina (Kaga y cols., 2006), o del HSF-1 que controla la expresión de proteínas de shock térmico que protegen a las células frente a determinados estímulos proapoptóticos (Bijur y cols., 2000). Igualmente la inhibición que la GSK3 ejerce sobre el factor eIF2B conduce a la inhibición de la síntesis proteica y favorece la apoptosis (Pap y Cooper, 2002). Por último la vía intrínseca de apoptosis también se ve facilitada por el efecto regulador que la GSK3 tiene sobre el factor de transcripción NF κ B (Rao y cols., 2004).

3.4.2.- Inhibición de la vía extrínseca de apoptosis por la GSK3.

La vía extrínseca de la apoptosis está mediada por los receptores de muerte que pertenecen a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral, como TNF-R1, Fas, DR4 (también conocido como TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2). Estos receptores contienen dominios intracelulares de muerte, críticos en la iniciación de la vía extrínseca de apoptosis (Ashkenazi y Dixit, 1998).

Estos receptores se activan a través de la homotrimerización del receptor (Krammer, 2000), que da lugar a la interacción con FADD (proteína asociada al dominio de muerte de Fas) y con la procaspasa-8 ó procaspasa-10, formando lo que se conoce como el complejo DISC (Peter y Krammer, 2003). Este complejo puede desencadenar la apoptosis por medio de la activación directa de caspasas efectoras (Kaufmann y Hengartner, 2001), o por una vía mixta de apoptosis en la que participan elementos de la vía intrínseca mitocondrial (Li y cols., 1998).

La actividad de la GSK3 protege frente a la toxicidad mediada por TNF α , ya que el efecto inhibidor del litio aumenta la sensibilidad de las células a este tipo de apoptosis (Beyaert y cols., 1989). Igualmente los ratones KO para GSK3 β morían prematuramente a día E14 por apoptosis masiva en el hígado como consecuencia de una hipersensibilidad celular al TNF (Hoefflich y cols., 2000).

La actividad inhibidora de la GSK3 sobre esta vía parece que se sitúa en un paso inicial de la señalización, precediendo incluso a la propia activación de la caspasa-8 (Beurel y Joep, 2006). La GSK3 también parece actuar negativamente sobre esta vía de muerte a través de la regulación de la actividad transcripcional de NF κ B. La GSK3 promueve la expresión selectiva de una serie de genes regulados por NF κ B y, dependiendo del tipo celular, las vías de señalización activadas pueden inhibir o promover la apoptosis (Steinbrecher y cols., 2005) (Beurel y Joep, 2006).

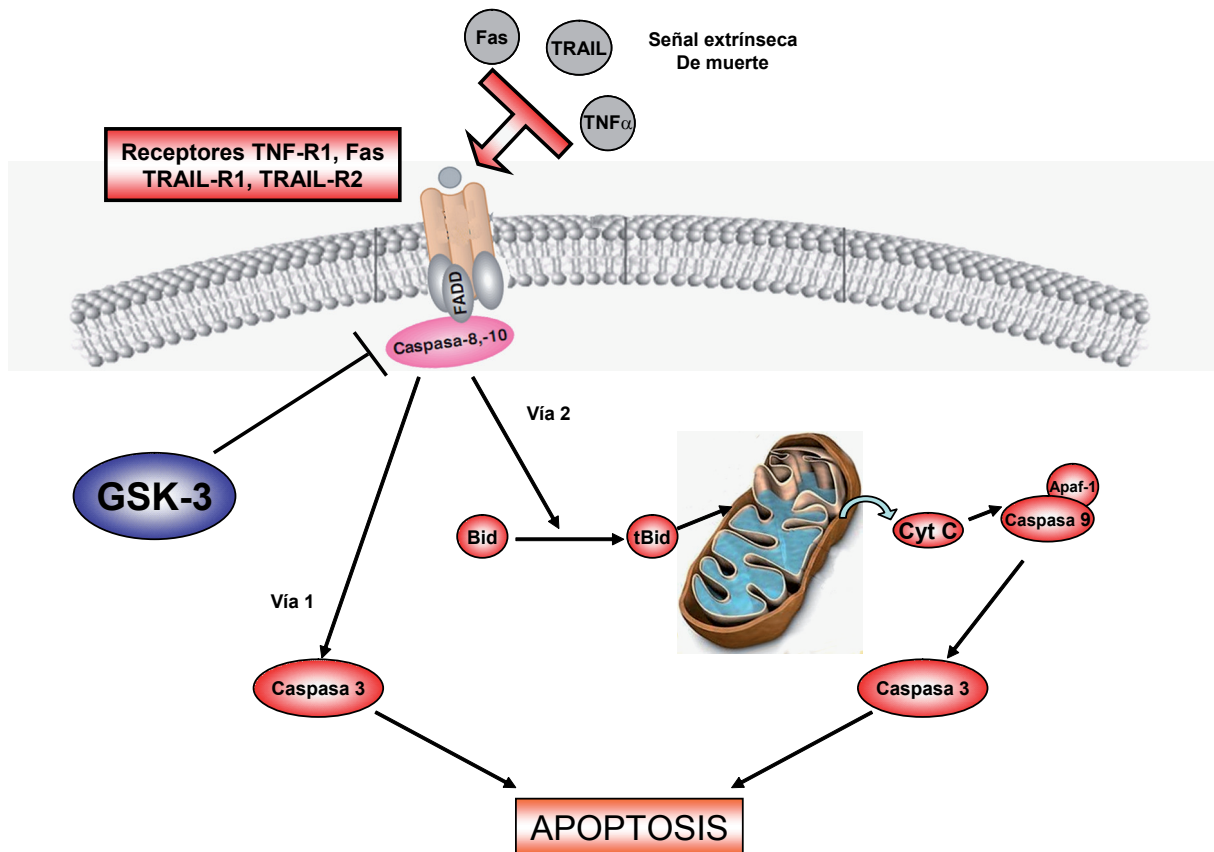


Figura 17.- papel de la GSK3 en la inhibición de la vía extrínseca de apoptosis. Esta vía de esta mediada por los receptores de muerte. Estos receptores se activan por medio de la homotrimerización del receptor, que da lugar a la interacción con FADD (proteína asociada al dominio de muerte de Fas) y con la procaspasa-8 ó procaspasa-10, formando lo que se conoce como el complejo DISC. Este complejo puede desencadenar la apoptosis por medio de la activación directa de caspasas efectoras (Vía 1), o por una vía mixta de apoptosis en la que participan elementos de la vía intrínseca mitocondrial (Vía 2). La actividad inhibitoria de la GSK3 parece darse en las primeras etapas de la vía impidiendo la activación de la caspasa 8 o 10.

3.5.- GSK3 y enfermedades asociadas. Posible dianas terapéuticas.

Como hemos indicado en los apartados anteriores, la GSK3 es una enzima clave en la regulación de numerosos procesos, con más de 40 sustratos identificados hasta la fecha, la GSK3 ejerce su regulación a nivel de señalización, plasticidad y estructura neuronal, metabolismo, síntesis proteica, expresión génica y apoptosis. Esta amplia gama de procesos en los que está involucrada lleva a que las alteraciones en su actividad estén relacionadas con el desarrollo de numerosas situaciones patológicas y que la GSK3 ofrezca una diana importante en la terapia de estas enfermedades.

La GSK3 está directamente relacionada con alteraciones del Sistema Nervioso como el trastorno bipolar, la depresión o la esquizofrenia. También se asocia a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y con otras como el cáncer, el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes (Joje y cols., 2007) (Joje y Roh, 2006) (Lee y Kim, 2007) (Bhat y cols., 2004). Igualmente, la GSK3 promueve la respuesta inflamatoria, elemento común en muchas de estas patologías.

GSK3 y trastornos del comportamiento.

El trastorno bipolar, junto con la depresión, forman principalmente lo que se conoce como trastornos del comportamiento. En el trastorno bipolar los pacientes sufren episodios maníacos seguidos de otros de depresión. Estas alteraciones suponen un peligro para el paciente debido a que en muchas ocasiones llevan asociados intentos de suicidio (Nestler y cols., 2002) (Belmaker, 2004).

Aunque los mecanismos exactos que regulan estas patologías no se conocen, sí se ha establecido una implicación de la GSK3 de forma indirecta, debido a los efectos beneficiosos de determinados agentes terapéuticos (Jope y Roh, 2006). Este es el caso del litio, utilizado para el tratamiento de este tipo de alteraciones durante más de 50 años, no descubriéndose hasta 1996, el efecto inhibidor que ejercía sobre la GSK3 (Klein y Melton, 1996). El efecto combinado del litio le permiten reducir la actividad catalítica de GSK3 sin llegar a su inhibición completa, lo que sería fatal para la función celular (Jope y Johnson, 2004).

La implicación de la GSK3 en el trastorno depresivo se estableció también de manera indirecta. La depresión se ha asociado con alteraciones en la actividad aminérgica, principalmente con el sistema noradrenérgico y serotoninérgico, estando los fármacos utilizados en el tratamiento de estos trastornos asociados a la activación de los receptores noradrenérgicos y serotoninérgicos o la inhibición de la recaptación de estos neurotransmisores. Tanto la activación de estos receptores, como la inhibición de la recaptación de los neurotransmisores, inducen la inhibición de la GSK3 (Li y cols., 2004). Igualmente, sobre los modelos animales utilizados para el estudio del comportamiento depresivo, la inhibición de la GSK3 indujo rápidamente efectos semejantes a los de los fármacos antidepresivos (Kaidanovich-Beilin y cols., 2004). A pesar de que las acciones exactas mediadas por GSK3 que son inhibidas por el litio y los antidepresivos no se conocen, una de las posibles dianas terapéuticas puede ser la reducción de la inflamación asociada a estos trastornos. Esta afirmación se refuerza con el reciente descubrimiento que asocia la GSK3 a la potenciación de la respuesta inflamatoria (Martin y cols., 2005).

GSK3 y esquizofrenia.

La esquizofrenia es un trastorno psicótico, con gran variación entre individuos, que cursa con alteraciones cognitivas, de conducta, percepción y afectivas. Aunque los mecanismos causantes de esta alteración aún no se han descubierto, ya que más que una enfermedad en sí, la esquizofrenia es un conglomerado de múltiples trastornos, sí parece claro que depende de alteraciones en el sistema dopaminérgico. Parece que existe una desregulación del equilibrio entre los receptores D1 y D2, con una disminución de la actividad de los receptores D1, asociada a una hiperactividad de los receptores D2. La GSK3 está regulada por estos receptores, ya que

mientras los agonistas de los receptores D1 inhiben la GSK3 en la corteza frontal de conejo (Gil y cols., 2003), la hiperactividad de los receptores D2 activa las isoformas α y β de la GSK3 (Beaulieu y cols., 2004) (Emamian y cols., 2004) (Mueser y McGurk, 2004) (Tamminga y Holcomb, 2005) (Laruelle y cols., 2003), (Friedman, 2004) (Tandon, 1999) (Krystal y cols., 2003).

La desregulación de la GSK3 también está asociada a las alteraciones de la vía de señalización de Wnt, que producen cambios en el desarrollo del sistema nervioso central que están relacionadas con la aparición de la esquizofrenia (Cotter y cols., 1998). Por último, también se ha asociado la esquizofrenia con alteraciones en la neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica, ya que ambas vías regulan la actividad de la GSK3 en cerebro. Luego todos estos datos en conjunto, sugieren la posible participación de la GSK3 en el desarrollo de esta enfermedad, aunque aún queda mucho por ser descubierto en este campo (Jope y Roh, 2006).

GSK3 y enfermedad de Alzheimer.

La GSK3 está frecuentemente asociada con los dos principales marcadores del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. El primero es intracelular, debido a la formación de los ovillos neurofibrilares por la hiperfosforilación de la proteína Tau. El segundo es extracelular, formado como consecuencia de la acumulación del péptido β amiloide (Kaytor y Orr, 2002). Los estadios tempranos de la enfermedad se asocian a varias mutaciones entre las que destacan las de la presenilina 1 y 2 (Sherrington y cols., 1995) (Levy-Lahad y cols., 1995) y el precursor amiloide. Según los conocimientos actuales, parece ser que es la acumulación de los oligómeros tóxicos del péptido amiloide lo que lleva, tanto a la formación de las placas extracelulares, como a la hiperfosforilación de Tau, lo que, a su vez, conduce a la disfunción sináptica y la muerte celular (Jope y cols., 2007).

La GSK3 participa activamente en esta patología, ya que promueve la formación del péptido amiloide, reduciéndose considerablemente con el uso de inhibidores selectivos de la GSK3 (Su y cols., 2004) (Phiel y cols., 2003). El péptido amiloide por su parte, incrementa la actividad de la GSK3 en cultivos celulares (Takashima y cols., 1996). Los mecanismos por lo que sucede esto no se conocen claramente, pero parecen estar relacionados con la capacidad de fosforilación que la GSK3 ejerce sobre el precursor amiloide (Aplin y cols., 1997), al igual que por la interacción que se produce entre la GSK3 y la presenilina 1 (Takashima y cols., 1998). En este sentido, las mutaciones de presenilina 1 asociadas al Alzheimer se unen más fuertemente a la GSK3 y potencian su actividad (Takashima y cols., 1998). Además de estas pruebas, la GSK3 es capaz de unirse a otros productos que se generan en el procesamiento del péptido amiloide (Kim y cols., 2003b) (Ryan y Pimplikar, 2005), y su inhibición reduce significativamente la neurotoxicidad inducida por la acumulación de estos péptidos (Alvarez y cols., 1999) (Wei y cols., 2000) (De Ferrari y cols., 2003). Todos estos datos indican los múltiples puntos de

regulación en los que puede estar actuando la GSK3 en este sentido.

Como hemos indicado anteriormente, el otro marcador de la enfermedad de Alzheimer es la formación intracelular de los ovillos neurofibrilares. Estos ovillos se producen como consecuencia de la agregación de las proteínas Tau hiperfosforiladas (Kaytor y Orr, 2002). La GSK3 aumenta su actividad en neuronas que forman estos ovillos y colocaliza con las neuritas distróficas y con los propios ovillos en el cerebro de enfermos de Alzheimer (Bhat y cols., 2004) (Pei y cols., 1997). Las neuronas que sufren degeneración granulovascular y que apoptizan mantienen igualmente una fuerte actividad de la GSK3 β (Leroy y cols., 2002). La GSK3 fosforila a Tau en su residuo de Thr231, provocando su separación de los microtúbulos (Cho y Johnson, 2004). Otros residuos de la proteína Tau son igualmente fosforilados por GSK3, muchos de los cuáles se encuentran fosforilados en el Alzheimer. Esta hiperfosforilación de Tau genera neurotoxicidad por sí misma, aparte de la desestabilización estructural y la alteración en la plasticidad neuronal (Fath y cols., 2002). La inhibición de la actividad de GSK3, en especial de la isoforma β (Phiel y cols., 2003), protege a las células de la toxicidad inducida por los agregados de proteína Tau hiperfosforilada (Noble y cols., 2005).

Por último, se ha descubierto más recientemente que la inflamación promovida por la GSK3 también puede contribuir a los mecanismos patológicos generados por la enfermedad de Alzheimer (Jope y cols., 2007). La acumulación de placas de péptidos amiloides y los ovillos neurofibrilares producen la activación de los astrocitos y la microglía próximas a las neuronas. Esto genera un efecto beneficioso debido a los factores de crecimiento que secretan y por el aclaramiento de las placas de péptidos A β (Nagele y cols., 2003) (Wyss-Coray y cols., 2003). Sin embargo, este efecto positivo se ve contrarrestado por el daño neuronal que causan, debido a la liberación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, y a la respuesta inflamatoria desencadenada por la liberación de citoquinas (Heneka y cols., 2001) (Griffin y cols., 1998).

La regulación de la actividad de la GSK3 como diana terapéutica puede ser esperanzadora en el estudio de esta enfermedad, como demuestran los estudios recientes en modelos animales, en los que la actividad regulada y normal de la GSK3 supuso una reversión a los niveles normales de la fosforilación de Tau y un descenso de la muerte neuronal asociada al Alzheimer (Engel y cols., 2006).

GSK3 y diabetes.

La GSK3 es una enzima clave en la síntesis del glucógeno, ya que fosforila e inactiva a la glucógeno sintasa, y además su actividad se ve reducida por la fosforilación en sus residuos de serina mediada por los receptores de insulina (Cross y cols., 1995). Estos datos constituyen un importante punto de partida para el estudio de su posible utilización terapéutica en enfermedades como la diabetes tipo 1, tipo 2 o el desarrollo de la resistencia a la insulina (Lee y Kim, 2007)

(Eldar-Finkelman, 2002).

Estudios en varios modelos animales revelaron que los niveles de fosforilación en serina de la GSK3 se veían alterados en este tipo de patologías. Los ratones con diabetes inducida por la dieta presentaban una actividad de la GSK3 β muy incrementada en el tejido adiposo epididimal, ligeramente reducida en el hígado y sin variaciones en el músculo esquelético (Eldar-Finkelman y cols., 1999), sugiriendo variaciones específicas según el tejido asociadas a la diabetes. En los humanos con diabetes tipo 2, sin embargo, la actividad de la GSK3 se incrementó un 100% en el músculo esquelético (Nikoulina y cols., 2000). Todos estos datos conducen a la hipótesis de que un aumento de la actividad de la GSK3 podría generar resistencia a la insulina o diabetes por medio de la inhibición de la síntesis de glucógeno y por lo tanto de la eliminación de la glucosa en sangre (Lee y Kim, 2007).

Con respecto al cerebro, se sabe que la insulina inhibe la GSK3 en cerebro de ratón (Planel y cols., 2004), mientras que en los modelos de resistencia a la insulina (Shin y cols., 2004) o en los de silenciamiento del receptor de insulina (Schubert y cols., 2004), se produjo una disminución de la fosforilación inhibidora de la GSK3. De la misma forma, los niveles de glucosa regulan la actividad de la GSK3 en cerebro (Jope y cols., 2007). La hiperglicemia, asociada o no al agotamiento de los niveles de insulina, supuso un incremento de los niveles de fosforilación en serina de la GSK3, mientras que la hipoglucemia los redujo (Clodfelder-Miller y cols., 2005). Luego, según estos datos, los niveles de fosforilación en serina de la GSK3 varían constantemente como resultado del aporte o no de alimentos. Estos estudios revelan también que las variaciones de la actividad de GSK3 son diferentes en el tejido periférico, si lo comparamos con el cerebro. Mientras que la GSK3 en ratones diabéticos está defosforilada y activa en el tejido epididimal, se encuentra fuertemente inhibida en cerebro. Por tanto, la insulina y los niveles de glucosa son elementos clave en la regulación de la GSK3 en cerebro.

La utilización de péptidos inhibidores de la GSK3 en ratones diabéticos (Plotkin y cols., 2003), o de la rosiglitazona, un ligando de los PPAR γ que también inhibe de la GSK3, en pacientes de diabetes tipo 2 (Smith y cols., 2004), redujo los niveles de glucosa en sangre y aumentó la tolerancia. Además, la sobreexpresión de GSK3 β en músculo esquelético fue suficiente para generar intolerancia a la glucosa (Pearce y cols., 2004).

GSK3 y cáncer.

La GSK3 está relacionada con la formación de tumores debido a su participación directa en las vías de señalización de Wnt/ β -catenina y PI3K/Akt. La activación de la vía de Wnt inhibe la GSK3 y activa la β -catenina que regula la expresión de oncogenes como ciclina D1, Myc y c-Jun (Polakis, 1999). De la misma forma, la vía de la PI3K/Akt inhibe la GSK3 y se

encuentra frecuentemente activada en numerosos tumores (Samuels y Ericson, 2006). Estos datos indicarían la posible utilización de la GSK3 como supresor tumoral, lo que se refuerza con el hecho de que no se hayan encontrado mutaciones inactivadoras para la GSK3 en tumores humanos (Lustig y Behrens, 2003). Sí se han encontrado mutaciones, sin embargo, para otros elementos de las vías de Wnt y PI3K/Akt (Polakis, 1999) (Samuels y Ericson, 2006), aunque esto puede corresponder al hecho de que una mutación espontánea de una isoforma de GSK3 sea compensada por la acción de la otra isoforma.

La alteración de la regulación de la actividad de la GSK3 está también asociada al avance de tumores, ya sea por un exceso de fosforilación temprana en Ser9 (Boissan y cols., 2005), o por defosforilaciones de su residuo de Tyr216 combinadas con fosforilaciones inhibitoras (Leis y cols., 2002). Los niveles de expresión de GSK3 se ven disminuidos en varios tipos tumorales (Goto y cols., 2002) (Mulholland y cols., 2006), estando únicamente aumentada en el cáncer colo-rectal, en el que las mutaciones presentes de β -catenina o APC hacen inútil su actividad catalítica. Estas mutaciones de la β -catenina suelen afectar a los sitios de fosforilación mediados por la GSK3 (Thr41, Ser37 y Ser33), haciéndola resistente a la ubiquitinización mediada por β -TrCP F box, que conduce a su degradación vía proteasoma (Gotoh y cols., 2003) (Shakoori y cols., 2005). Esto concuerda con los estudios realizados en ratones donde la sobreexpresión de una GSK3 inactiva supuso un incremento de tumores mamarios con respecto a los ratones control (Farago y cols., 2005).

La regulación de la localización de la GSK3 también puede contribuir al desarrollo de tumores. La desaparición de la fracción citosólica de GSK3 contribuye a la activación de la β -catenina y a la expresión de oncogenes. La actividad de la GSK3 no sólo se encuentra asociada a la formación del tumor en sí, sino también a su capacidad de proliferación, invasividad o metástasis, ya que la GSK3 fosforila y marca para su degradación a numerosos factores de transcripción clave en estos procesos. Este es el caso de c-Myc, β -catenina, Snail (clave en metástasis) y Bcl3 (Polakis, 1999) (Viatour y cols., 2004) (Zhou y cols., 2004). Como hemos citado anteriormente, la GSK3 potencia la vía intrínseca de apoptosis a través de factores de transcripción como p53 (Tan y cols., 2005) o CREB (Lonze y Ginty, 2002). Luego la reducción de la actividad de la GSK3 aumentaría la resistencia de las células tumorales a estímulos proapoptóticos como determinados agentes de la quimioterapia.

Todas estas evidencias indican que la GSK3 constituye una importantísima diana terapéutica en la regresión y erradicación de las células tumorales, así como en otras muchas patologías del ser humano.

OBJETIVOS

A decorative graphic element consisting of a horizontal line and a vertical line that meet at a right angle, forming an L-shape. The horizontal line is positioned below the word 'OBJETIVOS' and extends to the right. The vertical line is positioned to the right of 'OBJETIVOS' and extends upwards.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se había demostrado que las neuronas granulares coexpresaban una gran variedad de receptores de nucleótidos, tanto metabotrópicos como ionotrópicos. Se había iniciado el análisis de la señalización intracelular de estos receptores, demostrando su acoplamiento a la activación de la CaMKII. Nos planteamos seguir profundizando en la señalización, enfocando nuestros estudios hacia otro tipo de cascadas intracelulares relacionadas con funciones tróficas. A este respecto, existen muchos ejemplos en la literatura acerca del acoplamiento de los receptores de nucleótidos a señales de diferenciación, supervivencia y proliferación, pero sobre todo a nivel de células no neuronales. Teniendo en cuenta que las neuronas granulares de cerebelo constituyen un modelo muy adecuado para el estudio de los mecanismos de apoptosis y supervivencia neuronal, nos interesó estudiar el papel fisiológico de los nucleótidos en estas células, si compartían los mismos mecanismos de señalización que los factores tróficos y si podían ejercer funciones relacionadas con la neuroprotección. Por ello nos centramos en el estudio de la señalización de las rutas de las MAPK y la GSK3, estrechamente asociadas a funciones de supervivencia en estas células.

Estos antecedentes nos llevaron al planteamiento de los objetivos que se han desarrollado durante la realización de la presente tesis doctoral:

1.- Caracterizar en profundidad la señalización intracelular acoplada a los receptores de nucleótidos, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, identificando los principales receptores implicados en cada una de las vías de señalización. Con este propósito, se estudiaron dos enzimas que poseen funciones críticas en la diferenciación y en el equilibrio apoptosis/supervivencia en las neuronas granulares de cerebelo, la GSK3 y las ERK-1/2.

2.- Analizar las funciones fisiológicas derivadas de la señalización acoplada a los receptores purinérgicos sobre la GSK3 y las ERK-1/2, con especial énfasis en su efecto sobre la regulación de la supervivencia neuronal frente a determinados estímulos proapoptóticos.

3.- Estudiar la interacción del efecto mediado por los receptores de nucleótidos con otros receptores implicados en la supervivencia neuronal, como el receptor TrkB para BDNF, o los receptores de NMDA.

4.- Por último, analizar la variación en la expresión de determinados genes cuya transcripción puede estar regulada por sustratos de la GSK3 o de las ERK-1/2, y que puede verse afectada como consecuencia de la acción de los receptores purinérgicos sobre la regulación de la actividad de estas quinasas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1.- Material biológico

Ratas Wistar

Para los cultivos de neuronas granulares de cerebelo se emplearon ratas Wistar de 7 días de vida. Estas ratas fueron suministradas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Para la realización de este trabajo se utilizaron diferentes animales, siguiendo en todos los casos la normativa internacional para animales de laboratorio (ICLAS).

1.2.- Instrumentación.

1.2.1.- Instrumentación general.

En las etapas previas de preparación de medios de cultivos, tampones y disoluciones se emplearon los siguientes aparatos:

- Balanzas de precisión AND-ER60 y granatarios modelos AND versiones FX2000 y EW200.
- Agitadores magnéticos Agimatic-S de Selecta y Labinco y agitadores orbitales de Luckham modelo 802.
- pHmetros Crison 2001.
- Pipetas automáticas Gilson y Eppendorf.
- Sistemas de filtración Milli-RO/Milli-Q de Millipore.
- Centrífugas Omnifuge 2.0 RS Heraerus y microfugas para tubos Eppendorf modelos Beckman 11 y Eppendorf modelo 5415D
- Sistema espectrofotómetro Eppendorf Biophotometer plus para la medida de concentraciones de proteínas y de RNA.
- Para la conservación de las muestras se utilizaron los siguientes aparatos: Neveras Liebehr para la conservación a 4°C, Congeladores Liebehr para la conservación a -20°C y Congelador Forma Scientific para la conservación de muestras a -80°C.
- Para las incubaciones a determinadas temperaturas se emplearon baños termostatzados Tectron 3473100 y un calentador multibloque modelo thermomixer compact de Eppendorf.

1.2.2.- Cultivos celulares

La realización y manipulación de los cultivos para la obtención de neuronas granulares de cerebelo de rata y ratón y para la obtención de progenitores celulares de cortex embrionario de ratón se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar vertical Gelaire, modelos Twin 30 y T 48 de Cultek. Todo el material empleado en la disección y demás etapas de cultivo se esterilizó previamente en un autoclave Autotester-G de Selecta. Las células fueron sembradas en placas petri estériles de Falcon de 35, 60 y 100 mm de diámetro así como en placas de 6 y 24 pocillos Falcon y cubreobjetos de vidrio de 12 y 15 mm de diámetro de Deckgläser. Para el mantenimiento de los cultivos celulares una vez sembrados se emplearon pipetas de aspiración Fastpette de Labonet, Pipetas estériles de 25, 10 y 5 mL de Costar e incubadores Heraerus modelo B 5060 EK y NAPCO modelo 5415, con flujo controlado de CO₂ al 5% y temperatura constante de 37 °C. Todos los medios de cultivo se filtraron usando membranas Acrocap de 0.2 µm de tamaño de poro (Gelman Sciences), con la ayuda de una bomba peristáltica Millipore, o bien con filtros Millex-GS (Millipore) de 0.22 µm con ayuda de una jeringa estéril de 20 mL. Para el conteo de las células se empleó una cámara de Neubauer y un microscopio óptico Leitz HM-LUX 3, y para el seguimiento y observación de las células durante los días de cultivo se empleó un microscopio de contraste de fase Wilovert (Will). Para la realización de los cultivos celulares también se emplearon centrifugas Omnifuge 2.0 RS Heraerus y Rotante 460R Hettich Zentrifugen.

1.2.3.- RT-PCR

Para los experimentos de reacción de la transcriptasa inversa y de reacción en cadena de la polimerasa se emplearon los siguientes materiales:

Termociclador de Applied Biosystems modelo GeneAmp PCR System 2400, Espectrofotómetro Eppendorf Biophotometer plus, cubetas de electroforesis submarina modelo Hoefer HE 33 con su correspondiente fuente de alimentación de Amhersam Pharmacia, Transiluminador UV de Spectroline para la visualización de los geles y Sistema Fluo-S Multimager de Bio-Rad para la adquisición de imágenes.

1.2.4.- Microfluorimetría e inmunocitoquímica.

Para la determinación fluorimétrica de las medidas de Ca⁺² citosólico en células individuales se utilizó un microscopio de epifluorescencia NIKON TE-200 acoplado a una cámara ORCA-ER C47 42-80 de Hamamatsu. Los cultivos celulares se visualizaron con un objetivo Nikon Plan Fluor 20X con plano de apertura fija 0,5. Las preparaciones se excitaron con longitudes de onda de 340 y 380 nm seleccionadas con una rueda de filtros

Lambda 10-2 de Sutter Instrument Co. Todo el equipo se controló por medio del software Metafluor 6.2r & PC software (Universal Imaging Corp, Cambridge, UK).

La observación de los ensayos inmunocitoquímicos se llevo a cabo utilizando un microscopio de fluorescencia NIKON TE-200 equipado con una lámpara de Xenon de 75 W de Nikon y acoplado a una cámara Kappa modelo DX2. El control del sistema de adquisición de imágenes estuvo a cargo del software Kappa Image Base Control. La visualización de las células se realizó con un objetivo NIKON 20X/0,40 Ph1 DL. Las imágenes adquiridas de esta forma fueron procesadas posteriormente con los programas Lucida 3.0 (Kinetic imagin) y Paint Shop Pro 8.0 (Jasc Software).

1.2.5.- Western Blot.

Para la realización de esta técnica se emplearon los siguientes aparatos:

Sistema Mini-Protean 3 de Bio-Rad para la electroforesis, sistema Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell para la transferencia de proteínas, Maquina AGFA CP-1000 para el revelado de las membranas y sistema Fluo-S Imagen de Bio-Rad para el revelado de ciertas proteínas y el densitometrado de las bandas.

1.3.- Reactivos y productos químicos.

Todos los medios y soluciones fueron preparados con sales inorgánicas Merck de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. A continuación se detallan, en las siguientes tablas, los compuestos y reactivos utilizados, así como los anticuerpos empleados en las incubaciones y las concentraciones de los mismos. En general, cualquier sustancia no especificada en las tablas de compuestos, fue suministrado por los laboratorios Merck o Sigma-Aldrich.

Material y Métodos

Categoría y uso	Reactivo	Casa comercial
Cultivos de neuronas granulares	Neurobasal, Suplemento B27. Papaína, DNAsa, Ovomucoide EBSS, glutamina, AraC, solución de antibióticos/antimicóticos. Poly-L-lisina. Azul tripán.	Gibco Worthington Sigma Biochrom AG Merck
Experimentos de PCR Extracción y limpieza de RNA	RNeasy Mini Kit. Kit DNA free.	Quiagen Ambion
Geles	Agarosa D1, Agarosa M8. SYBR-Safe DNA gel stain.	Pronadisa Molecular Probes
RT	TaqMan [®] RT reagents.	Applied Biosystems
PCR	AmpliTaQGold. PCR Master Mix	Applied Biosystems, Sigma,
Inhibidores de RNAsas	DEPC, RNase-Zap.	Sigma
Microfluorimetría Sonda fluorescente de Ca ²⁺	 Fura-2 AM	 Molecular Probes
Farmacología Agonistas purinérgicos y antagonistas purinérgicos	ATP, 2MeSATP, 2MeSADP, UTP, UDP BzATP, α,β -meATP, 2MeSAMP, MRS- 2179, MRS-2211, PPADS, BBG, A-43, TNP-ATP.	Sigma, Tocris, Calbiochem.
Toxinas e inhibidores de proteínas de vías de señalización.	PTX, PP2, KN-62, Gö-6850, Wortmanina, LY294002, SB216763, U0126.	Calbiochem, Sigma.
Otros Agonistas y antagonistas.	NMDA, BDNF, IGF-1, MK-801, K-252a	Sigma, PeproTech.
Ensayos de viabilidad	LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit. Kit de ensayo de toxicología <i>in vitro</i> basado en el MTT. Kit de detección <i>in situ</i> de muerte celular (TUNEL)	Molecular Probes Sigma. Roche.

[illegible]

*El anticuerpo PHF-1 que reconoce la proteína Tau fosforilada en los residuos diana específicos de la GSK3, fue cedido por el Dr Peter Daines del Albert Einstein College of Medicine (Yeshiva University, New York).

Tabla 1.- Relación de compuestos químicos y reactivos utilizados.

2.- MÉTODOS

2.1.- Obtención y cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata.

El cultivo de neuronas granulares de cerebelo se obtuvo a partir de ratas Wistar de 7 días de vida siguiendo el método descrito por Meyer-Franke y col. (Meyer-Franke y cols., 1995) y modificado posteriormente por Pons y col. (Pons y cols., 2001), que se ha ilustrado esquemáticamente en la figura 1.

Se emplearon grupos de 6 ratas Wistar. Los animales se sacrificaron por decapitación utilizando tijeras estériles. Posteriormente los cerebelos se extrajeron con ayuda de unas pinzas de microdissección estériles, se introdujeron en medio de aislamiento, compuesto por 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM Hepes, 15 mM glucosa, 50 μM albúmina de suero bovino (BSA), 1,5 mM MgSO_4 , 50 U/mL de Penicilina y 50 mg/mL de estreptomicina, y se llevaron al interior de una campana de flujo laminar. Los cerebelos se pasaron uno a uno a una placa falcon de 35mm de diámetro, con unas gotas de medio de aislamiento para evitar la desecación del tejido, donde se eliminaron cuidadosamente con unas pinzas estériles todos los restos de meninges, materia blanca y vasos sanguíneos que acompañaban a los cerebelos. Una vez los cerebelos estuvieron completamente limpios se procedió a su disgregación mecánica con ayuda de unas pinzas y tijeras estériles, dejando el tejido en fragmentos de aproximadamente 1mm. Estos fragmentos se recogieron con una pipeta pasteur de plástico de 3mL, se pasaron a un tubo cónico de 50 mL completando con medio de aislamiento hasta un volumen de unos 5-10 mL y se dejaron sedimentar durante uno o dos minutos. Tras este paso se retiró el sobrenadante y se filtraron sobre los fragmentos de cerebelo 10mL de EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) conteniendo 100 U/mL de DNasa, 1 mM CaCl_2 , 1 mM de MgCl_2 , 5 mM de Cisteína, 2 mM de EDTA y 65,6 unidades de papaína, que se había activado previamente incubando la solución en una atmósfera a 37°C y 5% de CO_2 durante 30 min.

El tubo se cerró herméticamente y se mantuvo en agitación durante 45 min a 37°C y 250 rpm para que se efectuara la disgregación química del tejido por medio de la papaína. Durante este tiempo se prepararon dos tubos cónicos de 15 mL con 3mL de ovomucoide, el inhibidor de la papaína.

Una vez la incubación hubo concluido, se pasó el contenido del tubo varias veces por una pipeta pasteur de vidrio previamente esterilizada para terminar de disgregar el tejido. Durante este paso se añaden al tubo cónico 600 μL de Ovomucoide (15 mg/mL) para iniciar la inactivación de la papaína. Tras la disgregación se dejó reposar el contenido del tubo durante

unos minutos para que los fragmentos de tejido no disgregado sedimentaran, después se recogió el sobrenadante, se pasó a un tubo cónico nuevo y se centrifugó durante 5 minutos a 208xg. Se retiró el sobrenadante y el precipitado formado por las células se resuspendió en 6 mL de EBBS y se hizo pasar poco a poco por la pared de los tubos cónicos de ovomucoide previamente agitados para formar un gradiente de espuma. Después de esto se centrifugó a 172xg durante 5 min y el precipitado se resuspendió finalmente en 2 mL de medio Neurobasal (suplementado con B-27 al 2% (v/v), 20 mM de KCl, 0,5 mM glutamina y solución antibiótica/antimitótica 100X, que contenía 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomycin y 0,25 µg/mL de anfotericina por tubo). Una vez resuspendido se procedió a determinar el número de células vivas obtenidas por medio de su recuento en una cámara de Neubauer, utilizando como colorante vital el Azul de Tripán. Para ello se diluyeron 20 µL de la suspensión celular en 180 µL de medio Neurobasal (dilución 1:10). Posteriormente se mezclaron 50 µL de esta solución con 50 µL de Azul de Tripán (1:1 v/v) y se llevó a la cámara de Neubauer para el recuento bajo microscopio óptico. Se consideraron como células viables solo aquellas capaces de excluir el colorante, contándose por tanto sólo las células no azules. El Azul de Tripán se preparó al 0,5% en NaCl 138 mM y KH_2PO_4 48,5 mM (isoosmótico), se hirvió y una vez frío se ajustó el pH a 7,2-7,3 con NaOH (Keith, 1979). Normalmente la viabilidad de las preparaciones superó el 95%.

El número de células por mL se estimó según la relación:

$$\text{Nº células/mL} = \text{nº células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución.}$$

Tras el recuento las células se llevaron al volumen total necesario con medio Neurobasal completo para obtener la densidad celular deseada. Las células se sembraron a una concentración de 200.000 células/cm² sobre placas petri de plástico estériles o cubreobjetos de vidrio de 12 y 15 mm de diámetro y 0,15 mm de grosor, que previamente habían sido tratados con una solución de poli-L-lisina. La poli-L-lisina utilizada tenía una concentración de 0,1 mg/mL y fue diluida en PBS (dilución 2:1) (En el caso de los cubreobjetos se empleó solución de poli-L-lisina sin diluir). La poli-L-lisina diluida se filtró y posteriormente se trataron con ella tanto las placas como los cubreobjetos durante aproximadamente dos horas a temperatura ambiente, seguidamente se lavó tres veces con agua estéril para eliminar los restos de poli-L-lisina, y se dejaron secar. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a temperatura de 37°C, con atmósfera controlada de 5% de CO₂ y saturada de humedad. A las 24 horas se realizó un cambio total de medio y se añadió el antimitótico AraC (citocina arabinósido) a una concentración de 10 µM, para evitar la proliferación de células de origen glial. Un día antes del procesamiento del cultivo, se

Material y Métodos

reemplazo la mitad del medio, añadiendo medio sin AraC, para diluir el efecto del antimetabólico. Bajo estas condiciones, se obtuvo un porcentaje de neuronas granulares superior al 95%, sobre la población total en los cultivos. Las células fueron procesadas entre los 9 y 11 días de cultivo. (9-11 DIV, días “*in vitro*”).

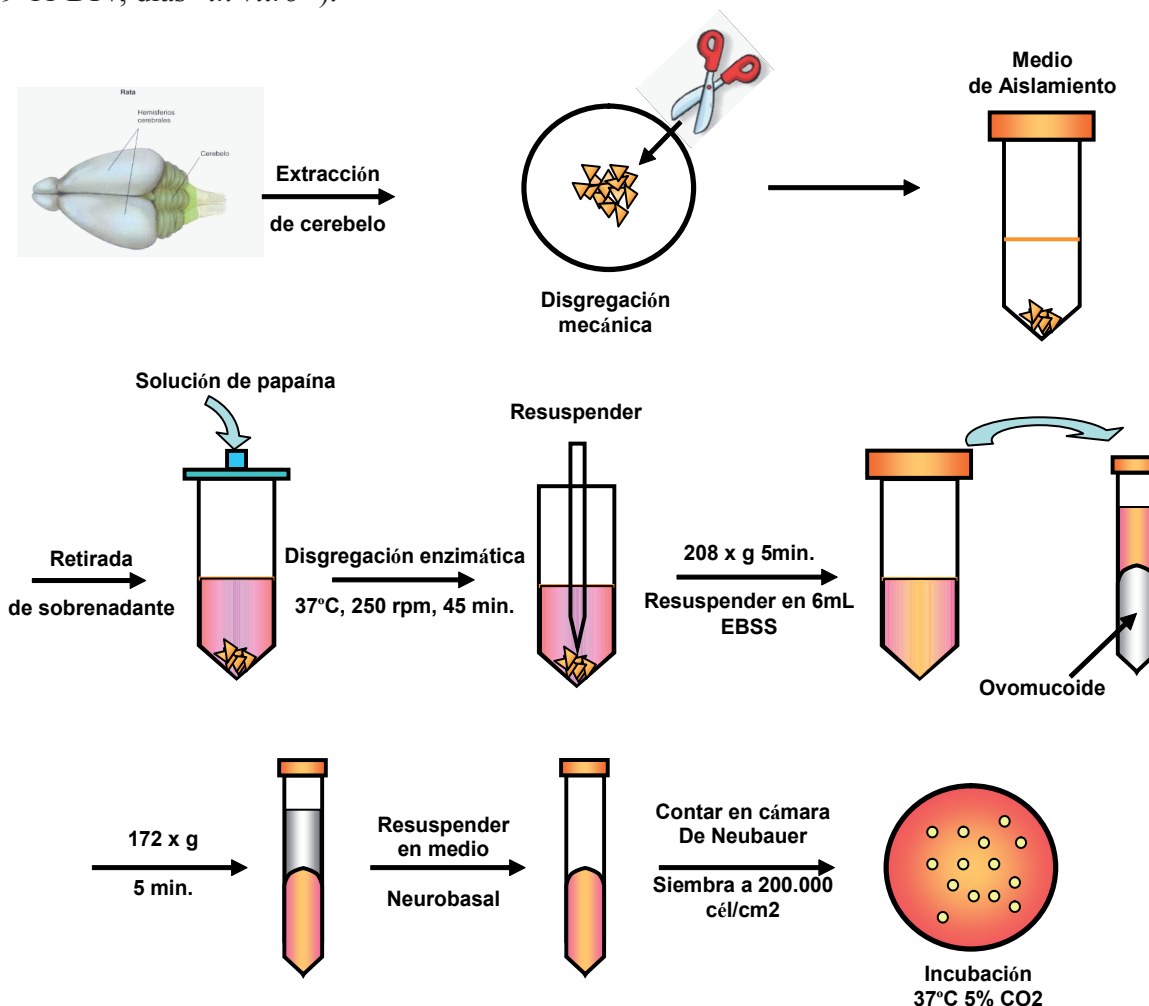


Figura 1.- Representación esquemática del cultivo de neuronas granulares de cerebelo.

2.2.- Técnicas de microfluorimetría: Determinación de la concentración intracelular de Ca²⁺ en neuronas granulares individuales.

La determinación de la concentración de Ca²⁺ citosólico libre en neuronas granulares de cerebelo, se realizó utilizando un método microfluorimétrico y empleando el indicador fluorescente Fura-2, según la técnica descrita por (Grynkiewicz y cols., 1985). El Fura-2 es un compuesto polianiónico hidrofílico que une específicamente Ca²⁺. En los ensayos se utilizó la forma acetoximetil éster Fura-2 AM, que dada su naturaleza hidrofóbica es capaz de atravesar la membrana plasmática de las células. Una vez en el citosol, las esterasas inespecíficas rompen

el enlace éster de modo que el Fura-2 liberado queda confinado en el citosol donde une el calcio libre para formar el complejo Fura- Ca^{2+} . La formación de este complejo da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose al mismo tiempo un desplazamiento hacia el UV del máximo del espectro de excitación, de 380 a 340 nm.(Figura 2)

Las células sembradas sobre cubreobjetos redondos de vidrio se incubaron con Fura-2/AM 5 μM en una solución salina de Locke normal suplementada con 1 mg/mL de Albúmina de suero bovino (BSA), durante 45 minutos a 37 °C. La composición del medio Locke es la siguiente: (en mM) NaCl 140, KCl 4,7, CaCl_2 2,5, MgSO_4 1,2, KH_2PO_4 1,2, Glucosa 5,5, Hepes 10; pH 7,4. Transcurrido este tiempo se paró el cargado de la sonda sacando los cubres de la solución de Fura-2 e introduciéndolos en otra conteniendo Locke con BSA. En el momento de realizar los ensayos los cubreobjetos se pegaron con grasa de vacío (hidrófoba) a la parte inferior de una cámara de perfusión (34 μL) de metacrilato. Esta cámara se situó sobre la platina de un microscopio de epifluorescencia y se conectaron a la cámara los tubos de silicona de entrada y salida para las soluciones de perfusión. Las soluciones de entrada se encontraban en un baño termostatzado a 37°C, y éste a su vez a una altura suficiente para que el flujo se mantuviese constante a 1.5 mL/min por simple diferencia de presión hidrostática. Tras llegar a la cámara el medio de perfusión se aspiró de forma continua mediante una bomba de vacío. Este sistema de perfusión continua evita que se acumule cualquier producto que pueda salir de las células durante la perfusión, o bien, cualquier producto de hidrólisis de los agonistas aplicados. Las células se perfundieron con medio Locke, solución en la que se disolvieron también los agonistas ensayados. Éstos se aplicaron durante 30 segundos. En los ensayos con antagonistas, éstos se aplicaron cinco minutos antes y durante la aplicación del agonista. En todos los experimentos se realizó una aplicación de KCl 30 mM con el fin de comprobar la viabilidad de las neuronas. Aquellas células que no se despolarizaban con KCl no se tuvieron en consideración en los análisis posteriores.

Una vez montada la cámara sobre el microscopio, las células se iluminaron alternativamente con luz de 340 y 380 nm, procedente un monocromador de ancho de banda 12 nm. La selección de las longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de Fura-2 saturadas de calcio (340) y Fura-2 libre de calcio (380). Del mismo modo, se comprobó que el punto isobéptico del Fura-2 (360 nm) coincidía con el descrito por (Castro y cols., 1994) .

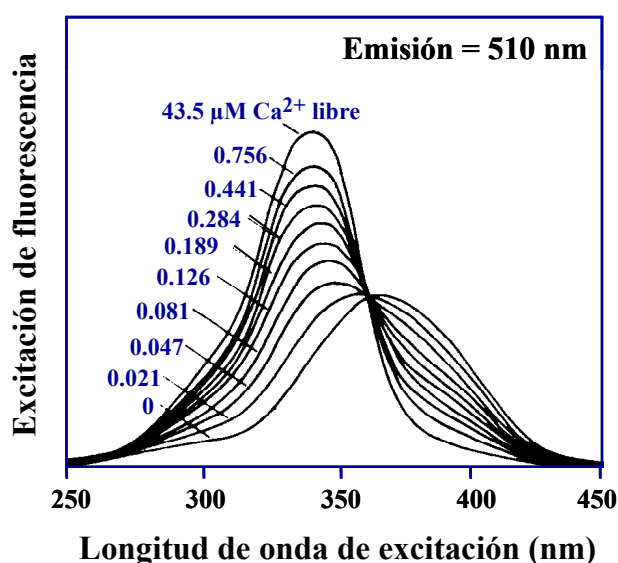


Figura 2.- Espectros de excitación de la sonda fluorescente para el Ca^{2+} , Fura-2, en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

El haz de luz monocromada se condujo hacia el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra la luz de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el Fura-2, de 510 nm, atraviesa el espejo dicróico y es conducida hacia la cámara ORCA-ER C 47 42-80 de Hamamatsu después de pasar por un filtro interferencial de paso de banda centrado a 510 nm. Para hacer las medidas de fluorescencia se usó un objetivo Nikon x20 de apertura numérica 0,5 (Figura 3).

Los registros de fluorescencia que se muestran en este trabajo corresponden a la variación temporal de fluorescencia de una región elíptica situada sobre las neuronas. Estos registros se muestran como la relación existente entre la fluorescencia a 340 y 380 nm (F_{340}/F_{380}) en función del tiempo. Antes de calcular la razón existente entre las dos longitudes de onda, se sustrajo a la sucesión de imágenes recogidas para cada longitud de onda el valor de fluorescencia basal obtenida en cada caso. (Figura 4).

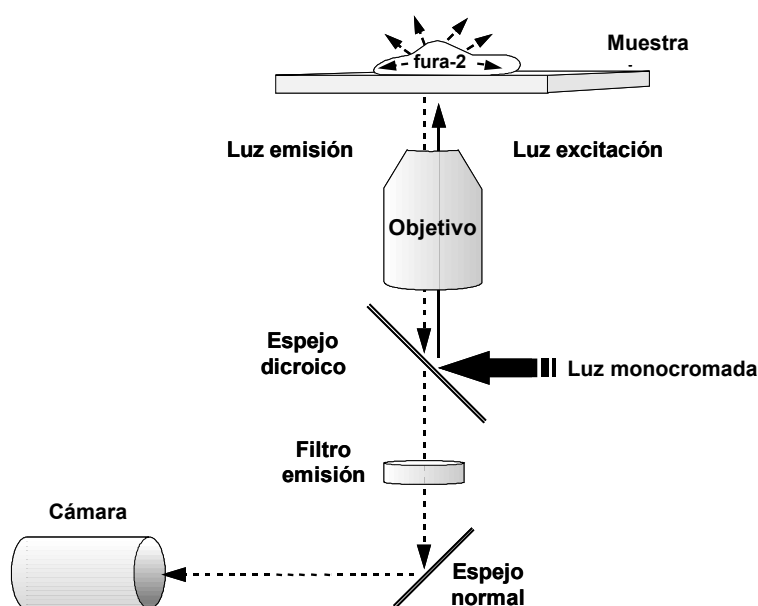


Figura 3.- Esquema representativo del sistema de microfluorimetría. La luz de excitación proviene de un monocromador que emite exclusivamente a la longitud de onda deseada (340 o 380 nm). El haz de luz monocromada llega al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico centrado en 430 nm y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el Fura-2 intracelular es capturada por el objetivo, atraviesa el espejo dicróico (>430 nm) y se dirige hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm. Por último, el haz de luz llega a la cámara CCD.

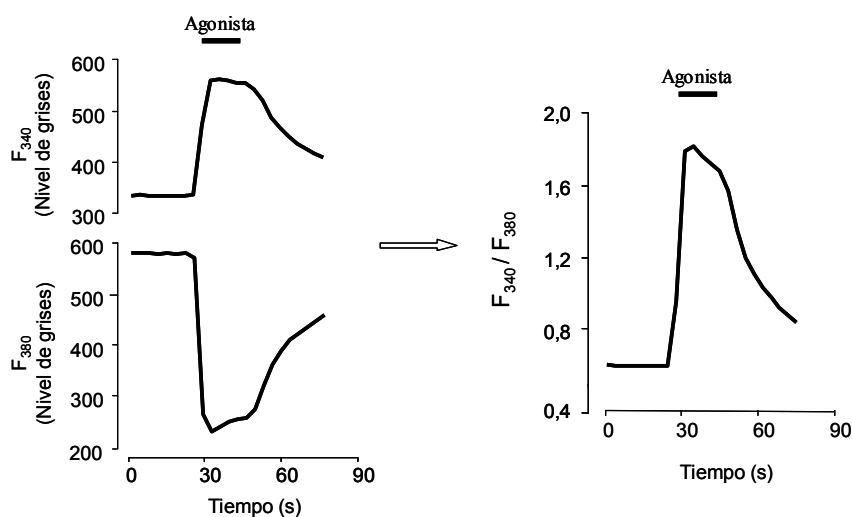


Figura 4.- Cálculo de la relación de fluorescencias a cada tiempo medidas a 340 y 380 nm. Los registros temporales de fluorescencia obtenidos para cada longitud de onda de excitación (340 y 380 nm) se dividen entre sí para obtener la ratio de fluorescencia F_{340}/F_{380} .

2.3.- Análisis de RNAm en neuronas granulares de cerebelo de rata

2.3.1.- Extracción de RNA

Los experimentos de RT-PCR y PCR semi-cuantitativa se realizaron a partir de dos tipos de muestras de partida. Por un lado, se utilizaron cultivos de neuronas granulares establecidos a partir de cerebelos de ratas de 7 días mantenidos durante 7 ó 14 días, y por otro, cerebelos enteros extraídos de ratas de 7 días de vida. La manipulación del RNA tuvo lugar en todo momento en condiciones libres de RNAsas. El procedimiento de extracción de RNA, común para ambos tipos de muestra en la mayoría de sus etapas, se realizó con un kit cuyo fundamento está basado en la capacidad de unión del RNA a una columna de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales (RNeasy Mini kit, Quiagen). La única diferencia entre ambas muestras de partida reside en la etapa inicial de preparación del tejido. En el caso de los cultivos se emplearon raspadores celulares estériles para levantar las células de las placas de 60 mm de diámetro y se utilizaron 350 μ L de tampón desnaturalizante (conteniendo isotiocianato de guanidina y β -mercaptoetanol 10 μ L/mL) para obtener el lisado celular. En el caso de los cerebelos completos, y tras retirar las meninges y restos de capilares sanguíneos, se realizó la disgregación con 600 μ L de medio desnaturalizante por 30 mg de tejido, empleando un potter previamente tratado con NaOH 0,1 N para eliminar cualquier actividad RNAsa.

Las muestras una vez disgregadas, se pasaron varias veces a través de agujas estériles de tamaño 20-G (0,9 mm de diámetro) para completar la homogeneización y disminuir la viscosidad del lisado. A continuación, se añadió un volumen igual de etanol al 70%, para conseguir las condiciones óptimas de unión. Las muestras se centrifugaron a $\geq 8.000 \times g$ en columnas que contenían la membrana de sílica gel a las que se unen por adsorción las moléculas de RNA mayores de 200 nucleótidos, quedando los RNA 5,8S, 5S y de transferencia en el eluido.

Después de cada extracción y de forma rutinaria las muestras de RNA se trataron con DNAsa RQ1 de acuerdo con el kit DNA free (ambion) para eliminar la posible contaminación del RNA con DNA genómico, durante 30 min a 37 °C. A continuación se añadió el reactivo de inactivación de DNAsa y se centrifugó a 10.000 xg, recogiendo el sobrenadante que contiene el RNA.

2.3.2.- Cuantificación de RNA

Para las muestras de RNA que se emplearon en experimentos de RT-PCR simple, la cuantificación se realizó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm. Teniendo en cuenta la dilución al efectuar la medida y que un valor de $A_{260} = 1$ corresponde a 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA, pudimos calcular la cantidad que obtuvimos tras la extracción. Para comprobar el grado de pureza de la disolución se empleó el cociente A_{260}/A_{280} que siempre estuvo entre 1.8-2 indicativo de la ausencia de proteínas en la preparación.

En los ensayos de PCR semi-cuantitativa, la cantidad de RNA es un factor crítico y fundamental para mantener el rigor en la estimación de las cantidades relativas en cada tubo de reacción. Por tanto las muestras de RNA que se destinaron a este tipo de experimentos se cuantificaron utilizando un método fluorimétrico de gran sensibilidad, que emplea el reactivo RiboGreen™ (RNA Quantitation Reagent, Molecular Probes). El RiboGreen unido al RNA tiene el máximo de excitación en torno a los 500 nm y el de emisión aproximadamente a 525 nm y permite una cuantificación de hasta 1 ng/mL de RNA.

2.3.3.- RT-PCR simple

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en dos fases. Una primera fase que consistía en la síntesis de la primera cadena de cDNA a partir del RNA purificado y una segunda fase en la que la DNA polimerasa amplificaba esta primera cadena de DNA.

Para la formación de la primera cadena de DNA se añadieron en el tampón de reacción y para un volumen final de 25 μL por tubo: 1,25 U/mL de la transcriptasa inversa Taq ManR, 2,5 μM oligo(dT)₁₆, 0,5 U/ μL de inhibidor de RNAsa, 5,5 mM MgCl_2 , la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0,5 mM cada uno), todo de un kit de Applied Biosystems, y 1 μg de RNA purificado. La transcripción inversa se realizó durante 30 minutos a 48 °C seguido de 5 minutos a 95 °C para inactivar la transcriptasa inversa.

En las reacciones de PCR utilizamos la DNA polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) en presencia de 1,5 mM MgCl_2 , la mezcla de dNTPs (0,2 mM cada uno), la pareja de oligonucleótidos específicos (300 nM cada uno) y 1-5 μL del producto de la reacción de la transcriptasa inversa anterior, en un volumen final de 25 μL . Las condiciones de amplificación fueron 85°C, 30s; 60°C, 30s; 72°C, 45s).

Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin cDNA molde. Además, para cada nueva muestra de RNA se realizó una reacción de RT en la que no se añadió la transcriptasa inversa Taq ManR, para comprobar si existía contaminación con DNA genómico en la muestra. Así, en todo momento se podía tener la seguridad de que los fragmentos amplificados en cada reacción correspondían a secuencias del RNAm presente en las células.

2.4.- Inmunotransferencia

2.4.1.- Extracción de proteínas a partir de neuronas granulares de cerebelo en cultivo.

Extracción de proteínas totales.

Para la extracción de proteína totales se utilizaron neuronas granulares de cerebelo que habían sido previamente sembradas en placas de 60 ó 100 mm de diámetro a una concentración de aproximadamente 15×10^6 células por placa. Estas neuronas se mantuvieron en entre 9 y 11 días en cultivo. Antes de la obtención de extractos las células se lavaron con Locke, suplementado con 2,5 mM de Ca^{+2} y 1,2 mM de Mg^{+2} , durante aproximadamente 2 horas, manteniéndose durante este tiempo a 37°C en un incubador. Este lavado previo es esencial para evitar la contribución de todos los elementos constituyentes del medio de cultivo (factores de crecimiento, etc.) y disminuir los niveles basales de las proteínas que se medirán en los ensayos (ERK, GSK3, etc.) y que suelen estar muy elevados en presencia de dichos factores. Pasado este tiempo y antes de llevar a cabo la incubación de las células con los correspondientes agonistas o antagonistas, se reemplazó el medio por Locke nuevo durante 5 min. En los experimentos donde se requerían estimulaciones en ausencia de Ca^{+2} o Mg^{+2} , este lavado de 5 min se realizó en presencia de medios Locke sin Ca^{+2} o Mg^{+2} , respectivamente. Una vez tratadas las células se retiró en su totalidad el medio y se añadieron 200 μL ó 500 μL , para las placas de 60 y 100 mm de diámetro respectivamente, de tampón de lisis frío, cuya composición es la siguiente: 20 mM MOPS, 50mM NaF, 40mM β -glicerolfosfato, 1mM Ortovanadato, 5mM EDTA, 2mM EGTA, 0,5% (v/v) Triton X-100, los inhibidores de proteasas (Cóctel Complete de inhibidores de proteasas de la casa comercial Roche) y 0,2 mg/ml de PMSF.

Las células se rasparon en frío en este tampón utilizando raspadores celulares estériles y el lisado obtenido se pasó a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 15700 x g durante 10 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante, donde se encontraban las proteínas totales solubilizadas.

Extracción de proteínas nucleares.

Para la obtención de extractos de proteínas de núcleo las neuronas granulares sembradas en placas de 10 mm de diámetro, se lavaron en PBS frío y se rasparon en 1 mL de este mismo medio. Los extractos recogidos de esta forma, se centrifugaron a 500 xg durante un minuto a 4° C. El precipitado resultante se resuspendió en 300 µL de tampón de lisis cuya composición es la siguiente: 2/3 de volumen de PBS, 1% (v/v) de Nonidet P-40, 1 mM de Ortovanadato sódico, 50 mM FNa, 0,5 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 1 mM DDT, 0,2 mg/ml de PMSF, Cóctel Complete de la casa comercial Roche. Una vez resuspendido se realizó una nueva centrifugación a 4000 x g durante un minuto a 4°C. El sobrenadante se guardó como fracción citosólica mientras que el precipitado, compuesto por la fracción nuclear se resuspendió en 58,5 µL de tampón de lisis al que se añadieron 1,5 µL de SDS 20% (v/v). Una vez resuspendida la fracción nuclear se llevó a un volumen de 300 µL con tampón de lisis y se almacenó convenientemente para su posterior utilización guardando una alícuota para la cuantificación de proteínas.

2.4.2.- Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de la concentración de proteínas presente en los extractos, tanto totales como nucleares, se llevó a cabo por el método de (Bradford, 1976). La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante un ensayo estándar mientras que la concentración de proteínas en las fracciones nucleares se determinó por un microensayo con sensibilidad en el rango de los microgramos. Este método se basa en el cambio de la absorbancia máxima que experimenta el azul de Coomassie cuando se une a las proteínas, pasando de 465 nm a 595 nm.

Como patrón se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA), construyéndose una recta patrón con los valores de absorbancia a 595 nm de esta proteína para diferentes diluciones conteniendo entre 0 y 75 µg, preparadas a partir de diluciones iniciales de 10 mg/mL. Para calcular la concentración de proteínas se ajustaron las mezclas problema a un volumen de 100 µL y se mezclaron con 5 mL del reactivo comercial Bradford de Bio-Rad que se había diluido 5 veces previamente. Se midió la absorbancia a 595 nm de la mezcla en el espectrofotómetro y se obtuvieron los valores de concentración de proteínas interpolando los resultados en la recta patrón.

Una vez conocidas las concentraciones de proteínas presentes en cada una de nuestras muestras se realizaron los cálculos necesarios para cargar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis.

2.4.3.- Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas.

Como primer paso se mezclaron tres volúmenes de los extractos de proteínas solubilizadas con un volumen de tampón de carga concentrado 4 veces y cuya composición es la siguiente: 50% (v/v) glicerol, 125 mM Tris-HCl 1 M pH 6,8, 20% (v/v) SDS 20%, 8% (v/v) Azul de Bromofenol 1%, 5% (v/v) β -mercaptoetanol (éste último añadido justo en el momento de utilización). Una vez bien mezcladas, las muestras se calentaron a 100 °C durante 4 minutos en un calentador multibloque y posteriormente se centrifugaron a 15700 x g durante un minuto. Estas muestras se cargaron en geles de poliacrilamida del 10% ó 12% (p/v) según fue requerido en cada caso, en presencia de SDS, de diez o quince pocillos, reservándose uno de estos pocillos para cargar la mezcla de patrones coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un sistema mini-Protean 3 de Bio-Rad, durante aproximadamente 120 minutos a un voltaje constante de 120 voltios y 4°C de temperatura, empleándose un tampón de electroforesis cuya composición es la siguiente: 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0,1% SDS, a un pH aproximado de 8,3.

Una vez las proteínas fueron separadas en función de su peso molecular por medio del proceso electroforético los geles se equilibraron en tampón de transferencia durante 30 minutos. La composición de este tampón de transferencia es la siguiente: 192 mM glicina, 25 mM Tris y 20% (v/v) de metanol, a un pH aproximado de 8,3. Del mismo modo se hidrataron y equilibraron las membranas de PDVF (Amersham Bioscience) que se iban a emplear en la transferencia de las proteínas de los geles. Para ello se introdujeron estas membranas durante 30 segundos en metanol, seguidos de 5 minutos en agua destilada y 30 min en tampón de transferencia. La transferencia de proteínas se llevo a cabo empleando un sistema mini-Trans Blot de Bio-Rad, a una intensidad de 240 mA durante 80 minutos.

Una vez las proteínas se habían transferido a las membranas de PDVF, estas se bloquearon en solución de bloqueo, compuesta por: TBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, a un pH de 7,5) conteniendo 1% (v/v) de Tween-20 y 3% de BSA, durante una hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Una vez concluido el bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario en tampón TBS-Tween 20 al 0,1% con BSA al 3% durante toda la noche a 4°C. La relación de los anticuerpos empleados y las concentraciones utilizadas pueden verse en la siguiente tabla:

Tras este paso, el exceso de anticuerpo se lavó con tampón TBS-Tween 0,1% y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (anti-IgG HRP de ratón o conejo, en función del anticuerpo primario utilizado (ver tabla 2)). Esta incubación

Anticuerpo primario	Dilución empleada	Anticuerpo secundario	Dilución empleada
Anti P-GSK3 (Ser 9/21) (conejo)	1:1000	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P-Akt (Thr308) (Ser 473) (conejo)	1:1000	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti Cleaved Caspase-3 (Asp175) (conejo)	1:1000	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti Tau (PHF-1) (ratón)	1:500	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro).	1:1000
Anti β -catenina (ratón)	1:1000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro).	1:1000
Anti P-Erk (E-4) (ratón)	1:1000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro).	1:5000
Anti Erk-2 (ratón)	1:1000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro).	1:5000
Anti GSK3 α/β (ratón)	1:1000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro).	1:1000
Anti P2Y1 (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2Y12 (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2Y13 (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2X1 (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2X2 (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2X3 (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2X4 (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2X7 intracel. (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti P2X7 extracel. (conejo)	1:200	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000

Tabla 2.- Anticuerpos primarios, secundarios y diluciones empleadas.

se llevó a cabo en tampón TBS-Tween 20 al 0,1% con BSA al 3%, a temperatura ambiente en agitador orbital durante una hora. El exceso de anticuerpo secundario se lavo empleando tampón TBS-Tween 20 al 0,1% y el revelado se llevo a cabo incubando la membrana durante 5 minutos con el kit Super Signal substrate Western Blotting de la casa comercial PIERCE. Este sistema se basa en la oxidación que la peroxidasa ligada al anticuerpo secundario ejerce sobre el luminol, presente en el kit, generando la emisión de luz que puede ser detectada por las membranas radiográficas o sistemas de imagen. En este trabajo se emplearon tanto membranas de radiografía Agfa, reveladas en una máquina Agfa CP1000, como el revelado en el sistema de Fluo-S Imager de Bio-Rad. La densidad de marcaje inmunoreactivo se llevó a cabo, en ambos casos, empleando un programa específico denominado Quantity One instalado en dicho equipo.

2.5.- Inmunocitoquímica.

Para los estudios de inmunocitoquímica se emplearon cubreobjetos de 12 y 15 mm donde se habían sembrado previamente las neuronas que habían sido mantenidas en cultivo durante 9-11 DIV. Los cubreobjetos se lavaron en PBS durante 5 minutos y seguidamente se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0,15 M a pH = 7,2 durante 15 minutos. Después del fijado se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon los cubreobjetos durante una hora a 37°C. La solución de bloqueo empleada estaba compuesta por PBS al que se le había añadido BSA al 3%, 0,1% de Tritón X-100, y 5% de suero de cabra o de burro en función de en qué animal habían sido desarrollados los anticuerpos secundarios que fuéramos a utilizar en el experimento. Tras el bloqueo se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-BSA al 3% y se incubó con el anticuerpo primario durante una hora a 37°C o bien a 4°C durante toda la noche. A continuación se realizaron tres lavados en PBS-BSA 3%, 0,1% Tritón X-100, para eliminar el exceso de anticuerpo primario. El marcaje se reveló incubando las preparaciones con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (FITC o Cy3) durante una hora a 37°C. Posteriormente a la incubación se realizaron dos lavados con PBS-BSA 3%, 0,1% Tritón X-100. En los casos en que los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI, éste se añadió tras el segundo lavado y se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavándose después los cubreobjetos con PBS para su eliminación. Por último, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando como medio de montaje el Prolong Antifade de Molecular Probes, que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Tras dejar secar el medio de montaje, los portaobjetos se almacenaron en oscuridad a 4°C. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron con un microscopio NIKON TE-200 acoplado a una lámpara de Xenón de 75 W de Nikon y a una cámara Kappa modelo DX2. Todo el equipo estuvo controlado por ordenador con un software Kappa Image Base Control. El procesamiento posterior de las imágenes adquiridas se realizó con los programas Lucida 3.0 (Kinetic Imaging) y Paint Shop Pro 8.0 (Jasc Software).

2.6.- Tratamiento de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo.

Los experimentos donde fue inducida la apoptosis por el bloqueo farmacológico de la PI3-K con el inhibidor LY-294002, fueron realizados sobre neuronas sembradas en placas de 24 pocillos, llevándose a cabo las incubaciones de los distintos tratamientos, directamente sobre el medio de cultivo completo. Los agonistas nucleotídicos, el NMDA y los factores de crecimiento empleados en estos tratamientos, se añadieron directamente sobre cada pocillo y, tras una incubación de 10-30 min, se añadió el inhibidor LY-294002 a una concentración final de 50 μ M. En los experimentos donde se utilizaron los inhibidores de las rutas de señalización, como GF-I, U-0126, PP-2 etc, se añadieron entre 20 y 30 min antes de la estimulación con los agonistas, mientras que en el caso de los antagonistas de receptores de nucleótidos, estos se preincubaron durante 5 min antes de la estimulación.

Por otra parte, las neuronas granulares sembradas en multiwells de 24 pocillos o cubreobjetos de vidrio requirieron incubaciones previas más amplias con los agonistas nucleotídicos (entre 2 y 3 horas), añadidos también directamente sobre el medio de cultivo, en los experimentos en los que se indujo la muerte celular por concentraciones tóxicas de glutamato o camptotecina. Tras este pretratamiento, se reemplazó el medio por otro nuevo al que se añadió una concentración de 200 μ M de glutamato ó 20-40 μ M de camptotecina, respectivamente, y también se añadieron de nuevo los agonistas. Esta estimulación se mantuvo durante 30 minutos tras los cuales se retiró completamente el medio y se añadió medio nuevo, manteniéndose las células así hasta la estimación de la viabilidad celular. Los tratamientos con los inhibidores de proteínas de señalización o con los antagonistas de receptores se llevaron a cabo de la misma forma que la descrita previamente para los tratamientos con LY-294002.

La viabilidad celular se determinó 24 horas después de la aplicación de los estímulos tóxicos, LY-294002, glutamato o camptotecina, respectivamente, empleando diferentes ensayos que describiremos en detalle a continuación.

2.7.- Medida de la actividad GSK3 in vitro.

La actividad de la GSK3 fue medida siguiendo el método descrito por Engel (Engel y cols., 2006). Tras la estimulación de las neuronas granulares con los agonistas nucleotídicos, se obtuvieron extractos celulares empleando el tampón de lisis (HEPES, PH=7.4 20mM, NaCl 100mM, FNa 10mM, Ortovanadato sódico 1mM, 1% TritonX-100, EDTA 1mM, EGTA 1mM e inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Después de 30 minutos de lisado en hielo, las células se centrifugaron a 13000 g durante 5 min a 4°C. La reacción se llevó a cabo incubando 25 μ L del extracto de proteínas en un tampón (Tris pH=7.5, 25mM, Dithiotreitol 1mM, Cl₂Mg

10mM) junto con el sustrato específico de la GSK3, el péptido GS-1 (Concentración final 30 μ M) y ATP (50 μ M más 2 μ Ci de γ^{32} PATP) a 30°C durante 10 min. GS-1 es un péptido sintético derivado de la secuencia de la Glucógeno sintasa, que contiene un residuo de Ser (21S*) fosforilado y tres zonas consenso para la fosforilación específica por parte de la GSK3. (Stambolic y Woodgett, 1994). Esta reacción se llevo a cabo en paralelo con otra en presencia de 20 mM del ClLi, que inhibe específicamente la actividad de la GSK3 (Davies y cols., 2000). Tras esto, las alícuotas se depositaron sobre un papel de fosfocelulosa p81 (Merck) lavado dos veces con ácido fosfórico 75mM y se midieron por un contador de centelleo. La diferencia entre la actividad quinasa observada en presencia o ausencia de ClCi fue considerada como la específica de la GSK3.

2.8.- Determinación de la viabilidad celular:

Los ensayos para determinar la viabilidad celular de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo de rata tras los diferentes tratamientos a las que fueron sometidas se llevaron a cabo por medio de tres protocolos diferentes basados en tres kit comerciales:

2.8.1.- Ensayo de viabilidad celular mediante el kit: LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit de Molecular Probes:

Este método se utiliza para diferenciar células vivas de las muertas utilizando dos parámetros de viabilidad celular, la actividad intracelular de las esterasas y la integridad de la membrana plasmática. Para ello utiliza dos sondas fluorescentes:

- **Calceína-AM:** Esta sonda puede atravesar la membrana plasmática libremente, pero queda retenida en el interior de las células emitiendo fluorescencia cuando las esterasas celulares ejercen su acción sobre ella (calceína libre). Por lo tanto la calceína tiñe las células vivas produciendo fluorescencia verde a 515 nm cuando se excita a una longitud de onda uniforme de 495 nm.
- **Homodímero-1 de Etidio:** Este componente puede penetrar en las células con las membranas dañadas y se une a los ácidos nucleicos emitiendo fluorescencia roja a 635 nm cuando se excita a 495 nm. El etidio permite, así, el marcaje de las células muertas.

Para estos ensayos se emplearon neuronas granulares de cerebelo de rata sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro que se mantuvieron en placas de 24 pocillos Falcon. Tras el tratamiento de las células con estímulos tóxicos, éstas se lavaron dos veces con tampón Locke y posteriormente se añadieron 200 μ L de la mezcla de trabajo a cada pocillo. Esta mezcla

estaba compuesta por Locke al que se le había añadido calceína 2 μM y homodímero-1 de Etidio 8 μM , a partir de las soluciones madre disuelta en DMSO que proporciona el kit. Las células se mantuvieron a 37°C en oscuridad durante 30 min, en presencia de dicha mezcla, tras los cuales se tomaron las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron en los 30 minutos siguientes empleando un microscopio NIKON TE-200 acoplado a una lámpara de Xenon de 75 W de Nikon y a una cámara Kappa modelo DX2. Todo el equipo estuvo controlado por ordenador con un software Kappa Image Base Control. El procesamiento posterior de las imágenes adquiridas se realizó con los programas Lucida 3.0 (Kinetic Imaging) y Paint Shop Pro 8.0 (Jasc Software). Una vez procesadas las imágenes se procedió a su conteo, contando por cada imagen las células vivas teñidas de calceína y las células muertas teñidas con etidio. El porcentaje de supervivencia se obtuvo sobre el número de células totales en cada campo.

2. 8. 2.- Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT.

Este kit de la casa comercial Sigma-Aldrich permite, con el empleo de un espectrofotómetro, la determinación de la viabilidad celular en función de la actividad mitocondrial de las células vivas.

Este método se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de romper el anillo de tetrazolio del componente clave del kit, el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio (que en disolución es amarillo), liberando cristales insolubles de formazán, de color morado. Estos cristales de formazán pueden ser solubilizados en isopropanol y medidos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Cuanto mayor sea el número de células vivas presentes, mayor cantidad de cristales de formazán se formaran y mayor será la absorbancia de la muestra.

Para este ensayo se emplearon neuronas granulares de cerebelo que habían sido sembradas en placas falcon de 24 pocillos previamente tratadas con poli-L-lisina, como explicamos previamente en el protocolo de cultivos celulares. Tras la incubación de las células con los estímulos tóxicos, se les retiró el medio completamente y se le añadió Tampón Locke al que se le había añadido solución reconstituída de MTT a una concentración de 1,2 μM , manteniéndose en incubación a 37°C durante 2-3 horas. Tras este paso se añadió Tampón de solubilización (10% Triton X-100, 10% HCl 1 N, 80% Isopropanol) en volumen igual al que teníamos en el pocillo, agitando la placa durante 30-60 minutos, en agitador orbital, hasta que el formazán se solubilizó completamente. Como último paso se rasparon los pocillos para homogeneizar toda la mezcla y se midió la longitud de onda a 570 nm con ayuda de un espectrofotómetro. Como blanco se empleo una solución de MTT reconstituido en ausencia de células y mezclado con el tamón de solubilización. Los datos de absorbancia obtenidos de las muestras control, que no habían sido sometidas a ningún tratamiento, se ajustaron como referencia al 100% de

supervivencia, calculando así, el porcentaje de viabilidad de las células presentes en los pocillos sometidos a diferentes tratamientos.

2. 8. 3.- Kit de detección *in situ* de muerte celular (TUNEL) de Roche.

Este kit comercial permite la detección de las células que entran en fase de apoptosis en un cultivo o tejido permitiendo diferenciarlas de aquellas que mueren por necrosis. Durante la apoptosis se produce la ruptura del DNA genómico produciéndose pequeños fragmentos de bajo peso molecular de DNA al igual que fragmentos de alto peso molecular de DNA en forma de hebras simples. Este kit utiliza la acción del enzima deoxynucleotidiltransferasa terminal para incorporar nucleótidos marcados en el extremo 3'-OH del DNA fragmentado, estos nucleótidos marcados son detectables y cuantificables por medio de microscopía de fluorescencia. La reacción de TUNEL marca preferentemente los fragmentos de DNA que se generan durante la apoptosis permitiendo una discriminación bastante precisa entre este tipo de muerte celular y la necrosis. Para este ensayo se emplearon neuronas granulares de cerebelo que habían sido sembradas en placas falcon de 24 pocillos previamente tratadas con poli-L-lisina, como explicamos previamente en el protocolo de cultivos celulares. Tras los distintos tratamientos, a las células se les retiró completamente el medio y fueron lavadas con PBS. Tras el lavado las células se trataron con solución de fijado (4% Paraformaldehído en PBS, pH 7,4) durante una hora a temperatura ambiente, seguidamente se lavaron de nuevo con PBS y se incubaron con la solución de permeabilización (0.1% Tritón X-100 en 0,1% de citrato sódico) durante 2 minutos a 4°C. Tras este paso se añadió 50 µL de la mezcla de reacción TUNEL (compuesta por la solución enzimática más los nucleótidos marcados) a cada pocillo y se incubaron durante una hora a 37°C en atmósfera humidificada (En este paso se reservaron dos pocillos para controles negativos a los que se añadió únicamente la solución con nucleótidos marcados en ausencia del enzima). Posteriormente los pocillos se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante 5 min con DAPI 1µM para la tinción de los núcleos. Seguidamente se realizó un último lavado con PBS y se analizaron las preparaciones por microscopía de fluorescencia con un microscopio NIKON TE-200 acoplado a una lámpara de Xenon de 75 W de Nikon y a una cámara Kappa modelo DX2. Todo el equipo estuvo controlado por ordenador con un software Kappa Image Base Control. Se cuantificaron las células positivas (en rojo), normalizándose con respecto al número total de células por campo (las teñidas con DAPI), y calculándose así, el porcentaje total de células apoptóticas en cada tratamiento.

2.9.- Análisis de microarray.

Se obtuvieron extractos de RNA de cultivos de neuronas granulares de cerebelo control, y estimuladas durante 2 horas con 2 MeSADP 1 μ M, o con BzATP 300 μ M. Cada una de estas muestras se hibridó con un chip genómico de expresión Agilent, con capacidad para medir la expresión de 28000 genes de rata. Se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento y los extractos no estimulados control. Los datos de expresión resultantes fueron normalizados según el método por quantiles descrito en B. et al (Bolstad y cols., 2003) e implementado en el paquete de análisis affy (Gautier y cols., 2004) para el entorno estadístico R.

Las diferencias de expresión entre las muestras tratadas y el control se obtuvieron mediante el análisis estadístico (t-student) de la expresión media de cada uno de los genes en los dos grupos y su posterior corrección por el método de Bonferroni*. Para ello se utilizó la plataforma de análisis de microarrays GEPAS (Tarraga y cols., 2008) y el entorno estadístico R.

El análisis funcional de los genes según su grado de expresión diferencial se llevó a cabo usando el programa bioinformático FatiScan (Al-Shahrour y cols., 2008), actualmente implementado sobre la plataforma web Babelomics (Al-Shahrour y cols., 2008). Este método permite, mediante un test de segmentación, detectar grupos funcionales de genes que presentan además diferencias de expresión. Se usó un tamaño de partición de 50 genes, un test de Fisher de dos colas, y un grado de significación $p < 0.005$.

2.10.- Análisis estadístico de los datos.

Los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM). Los resultados mostrados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos en duplicado realizados en tres cultivos de neuronas granulares diferentes. Las comparaciones entre medias se realizaron con un análisis de la varianza (ANOVA). Los niveles de significación establecidos han sido: $P < 0,001$, diferencia extremadamente significativa (***) ; $P < 0,01$, diferencia significativa (**); $P < 0,05$, diferencia marginalmente significativa (*). Los niveles superiores a 0,05 se han tomado como no significativos (NS). Para un análisis posterior a la obtención de un ANOVA inferior a 0,05, se utilizó el post-test de Tukey-Kramer, o bien, el test de Dunnet.

RESULTADOS

1.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS ACOPLADA A LA PROTEÍNA GSK3 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

1.1.- Señalización de los receptores nucleotídicos P2Y de tipo metabotrópico acoplada a la GSK3 en neuronas granulares de cerebelo. Señalización mediada por el receptor P2Y₁₃.

En trabajos previos del grupo se había observado que las neuronas granulares de cerebelo de rata respondían a distintos agonistas nucleotídicos con incrementos en la concentración intracelular de calcio $[Ca^{+2}]_i$ (Hervas y cols., 2003). Estas respuestas a nucleótidos eran máximas en la segunda semana de cultivo (10-14 DIV), indicando que la expresión de los receptores de nucleótidos va paralela a la maduración y diferenciación del cultivo. Estos incrementos de calcio observados no desaparecían al eliminar el calcio del medio extracelular, y por tanto parecían estar mediados, en su mayor parte, por receptores de nucleótidos de carácter metabotrópico, como P2Y₁, P2Y₄ y P2Y₆, ya que respondían a los agonistas nucleotídicos 2MeSATP/ 2MeSADP, UTP y UDP, respectivamente.

A partir de estos primeros datos observados en las neuronas granulares decidimos investigar qué rutas de señalización eran activadas por nucleótidos más allá de las variaciones iniciales de calcio intracelular. Como primera aproximación de estudio elegimos la proteína GSK3, involucrada en numerosas funciones dentro del sistema nervioso central entre las que destaca su papel clave dentro de las vías de señalización de supervivencia activadas por neurotrofinas y factores de crecimiento en muchas células neuronales (Grimes y Jope, 2001). De hecho, las neuronas granulares constituyen un excelente modelo para el estudio de las vías de apoptosis y supervivencia neuronal en las que la GSK3 juega un papel predominante (Contestabile, 2002); (Pap y Cooper, 1998) (Hetman y cols., 2000) (Cross y cols., 2001) (Chin y cols., 2005). Todos estos antecedentes constituyen un buen punto de partida para la investigación de la posible implicación de los nucleótidos en una vía de señalización semejante a los factores de crecimiento y promoviendo la supervivencia en este modelo neuronal. El estudio fue iniciado en primer lugar utilizando los agonistas de los receptores metabotrópicos, continuando los efectos observados en las respuestas de calcio.

1.1.1.- Fosforilación de la proteína GSK3 mediada por agonistas nucleotídicos de tipo metabotrópico en neuronas granulares. Efecto del 2MeSADP.

En una primera aproximación se analizó el efecto de diferentes agonistas nucleotídicos que activan receptores de tipo metabotrópico sobre el estado de fosforilación de la proteína GSK3 en neuronas granulares, por medio de experimentos de Western Blot. Como se observa en la figura 1A los mayores incrementos en la fosforilación de la proteína GSK3 fueron inducidos por el ATP, agonista endógeno general capaz de activar receptores de nucleótidos tanto ionotrópicos como metabotrópicos. Este agonista incrementó unas 3 veces los niveles basales de fosforilación de GSK3 (en sus residuos de serina 21 y 9 para las isoformas α y β , respectivamente). Después del ATP, el agonista más potente resultó ser el 2MeSADP, agonista selectivo de receptores de ADP ($P2Y_1$, $P2Y_{12}$ y $P2Y_{13}$). El 2MeSADP produjo un incremento en la fosforilación de la GSK3 de aproximadamente dos veces por encima de los niveles basales. En cambio, los agonistas UTP y UDP, específicos de los receptores que responden a pirimidinas $P2Y_2$ - $P2Y_4$ y $P2Y_6$, respectivamente, mostraban efectos muy minoritarios. Estos resultados concordaban con lo esperado, ya que, siguiendo la línea de los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo en las respuestas de calcio, en las neuronas granulares la población mayoritaria de células sensibles a nucleótidos respondían a 2MeSATP y 2MeSADP, mientras que las respuestas a nucleótidos de pirimidina se encontraban en poblaciones muy minoritarias de células. Estos datos nos llevaron a continuar el resto del estudio de señalización utilizando el 2MeSADP.

Los incrementos de fosforilación inducidos por este agonista sobre la GSK3 eran transitorios, observándose ya a tiempos de 5 minutos y alcanzando sus niveles máximos a tiempos de entre 10-15 minutos de estimulación, y volviendo progresivamente a los niveles basales a tiempos más largos de 1 a 2 horas (figura 1C). Para los siguientes experimentos se eligió, por tanto, el tiempo de 10 minutos de estimulación con 2MeSADP, con el fin de obtener los niveles más altos de fosforilación sobre la GSK3.

La naturaleza metabotrópica de la respuesta inducida por el 2MeSADP se confirmó al retirar el calcio extracelular añadiendo al medio una mezcla quelante de EGTA/Tris, según se indica en el apartado de Material y Métodos (Figura 1B). En estas condiciones, el efecto del 2MeSADP sobre la fosforilación de la proteína GSK3 no se vio afectado. Ni tampoco cuando los experimentos se realizaron en presencia de adenosina deaminasa (ADA) (Figura 1D), que eliminaría la posible contribución debida a la adenosina formada por la hidrólisis extracelular del 2MeSADP. Por lo tanto, las posibles interferencias en los efectos del 2MeSADP por parte del sistema de receptores de adenosina fueron descartadas.

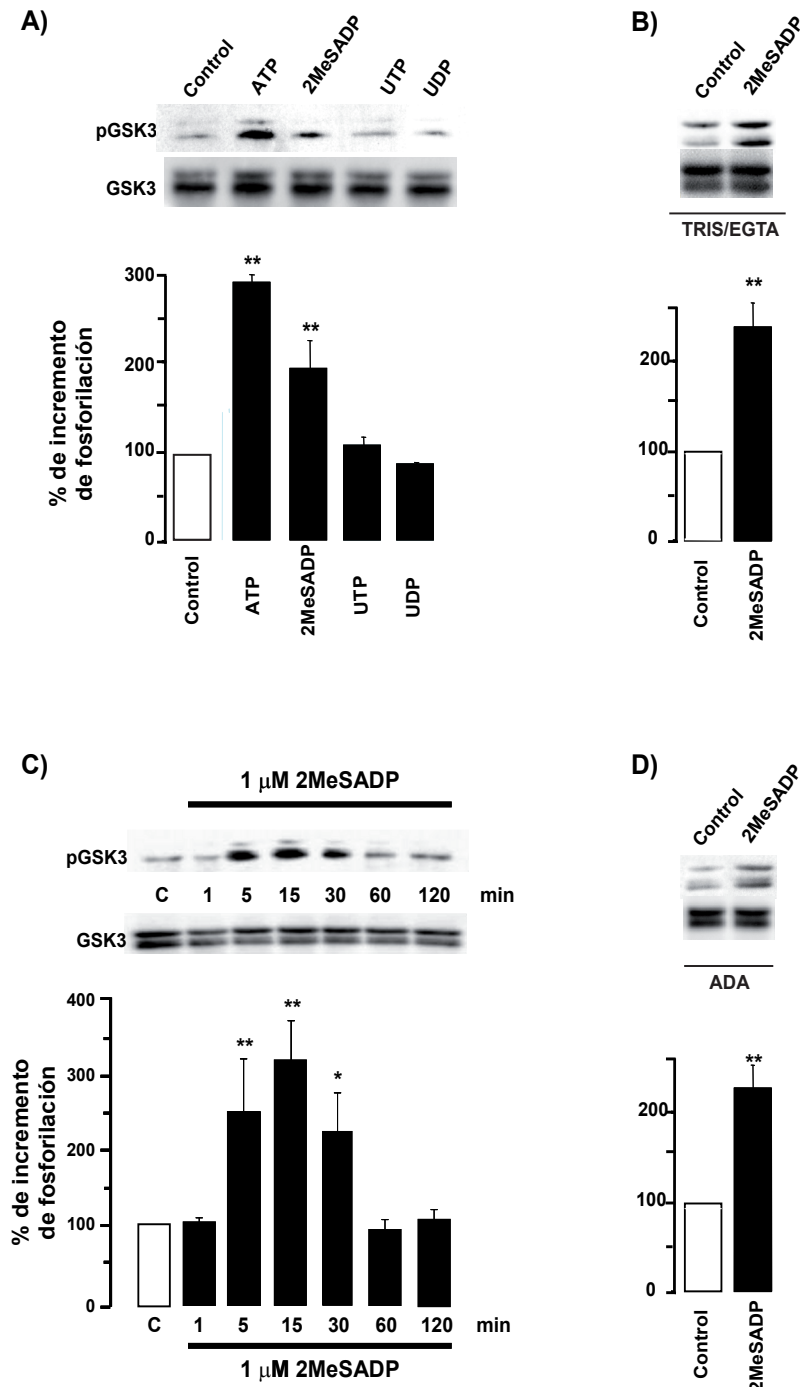


Figura 1.- Efecto de diferentes agonistas nucleotídicos de tipo metabotrópicos sobre la fosforilación de la GSK3. **A)** Las neuronas granulares de cerebelo se estimularon con los diferentes agonistas nucleotídicos: ATP 100μM, 2MeSADP 1μM, UTP 100μM y UDP 10μM. **C)** Las neuronas granulares se estimularon con 2MeSADP 1μM a diferentes tiempos de incubación. **B)** y **D)** Cuando se requirió la estimulación con 2MeSADP se realizó durante 10 min en ausencia de calcio extracelular, empleando una mezcla quelante de TRIS/EGTA o bien en presencia de adenosina deaminasa (1U/mL). Posteriormente las células fueron lisadas y se recogieron los extractos celulares donde se analizaron los niveles de fosforilación de la GSK3 (con anticuerpos específicos para reconocer los residuos fosforilados de ser 21 y ser 9, para las isoformas α y β, respectivamente) por inmunotransferencia, como se describe en el apartado 2.4 de Material y Métodos. Los histogramas muestran el porcentaje de incremento de fosforilación con respecto a las células no estimuladas (100% valor control) y se obtuvieron normalizando los valores densitométricos de la fosfo-GSK3 con respecto a los valores de GSK3 total. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media ± SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes, Siendo las bandas de Western Blot de la parte superior de la figura, las correspondientes a un experimento representativo. Los datos se analizaron por medio del test estadístico de Dunnett considerándose significativos estadísticamente a *p<0.05 y **p<0.01.

1.1.2.- Identificación del receptor implicado en la respuesta inducida por el 2MeSADP sobre la fosforilación de la proteína GSK3 en neuronas granulares.

Teniendo en cuenta que el 2MeSADP puede ser agonista de varios subtipos dentro de la familia de receptores que responden a ADP ($P2Y_1$, $P2Y_{12}$ y $P2Y_{13}$), se emplearon antagonistas específicos para cada uno de ellos, con el fin de identificar cuál de ellos estaba implicado en los efectos mediados por el 2MeSADP sobre la fosforilación de la GSK3 en neuronas granulares de cerebelo.

En el momento de la realización de estos estudios se disponía de antagonistas selectivos para los receptores $P2Y_1$ y el $P2Y_{12}$, siendo éstos el MRS-2179 y el 2MeSAMP, respectivamente (Boyer y cols., 1998); (Hollopetery cols., 2001). Como se observa en la figura 2A, ninguno de estos antagonistas fue capaz de abolir los efectos mediados por el 2MeSADP sobre la fosforilación de la GSK3, de hecho, en presencia del antagonista del $P2Y_1$, MRS-2179, el efecto del 2MeSADP parecía potenciarse ligeramente. Tampoco tuvo efecto el PPADS (figura 2B), antagonista por el que muestra sensibilidad el receptor $P2Y_1$ (King, 2003). Estos resultados sugerían que otro receptor de ADP distinto del $P2Y_1$ y el $P2Y_{12}$ sería responsable de la fosforilación de la GSK3 inducida por el 2MeSADP, y que podría tratarse por tanto de un receptor $P2Y_{13}$.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se comercializó un antagonista para el receptor $P2Y_{13}$, el MRS-2211 (Kim y cols., 2005) (biochem pharmacol). Este compuesto indujo por sí mismo un incremento basal en los niveles de fosforilación de la GSK3 y abolió completamente los incrementos producidos por el 2MeSADP (figura 2C). Cuando se usó conjuntamente con el antagonista selectivo del receptor $P2Y_1$, MRS-2179, también se eliminó el efecto del 2MeSADP, indicando la participación de un receptor tipo $P2Y_{13}$ en el efecto mediado por el 2MeSADP.

Para comprobar definitivamente este hecho, se llevaron a cabo experimentos dosis-respuesta con 2MeSADP y con el agonista endógeno, el ADP, ya que la afinidad relativa por estos dos compuestos puede usarse como prueba adicional para distinguir entre un receptor $P2Y_{12}$ y $P2Y_{13}$, ambos estrechamente relacionados. Como se muestra en la figura 3, los valores de las EC_{50} obtenidos fueron muy similares para ambos agonistas, de $9,12 \pm 2,2$ nM para el 2MeSADP (figura 3A), y ligeramente inferiores para el ADP, $3,58 \pm 1,3$ nM (figura 3B). Estos datos encajaban perfectamente con las afinidades descritas en el rango nM para los receptores de nucleótidos de ADP (Communi y cols., 2001) (Sellers y cols., 2001). Además se ajustaban más a lo descrito para un receptor tipo $P2Y_{13}$, debido a que mostraba una potencia similar frente al 2MeSADP y al ADP, en comparación con el receptor $P2Y_{12}$ que exhibe 50 - 100 veces más afinidad para el 2MeSADP ((Communi y cols., 2001) (Fumagalli y cols., 2004).

A continuación se analizó la presencia del receptor $P2Y_{13}$ a nivel de RNAm y de proteína

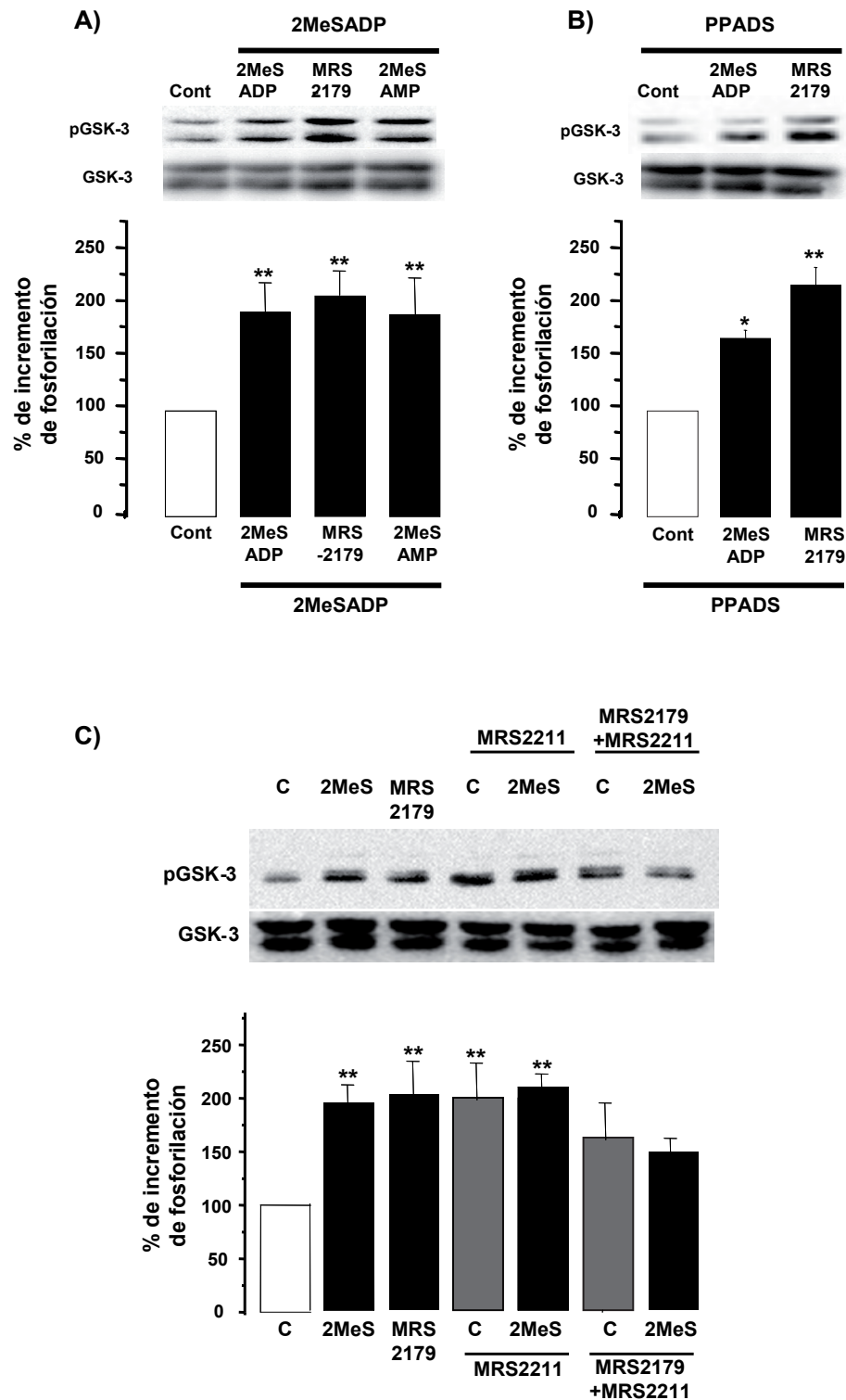


Figura 2. Efecto de distintos antagonistas de receptores nucleotídicos sobre la fosforilación de la GSK3 inducida por 2MeSADP. A), B) y C) Las neuronas granulares fueron preincubadas con durante 5 min con MRS-2179 10 μ M, 2MeSAMP 100 μ M, MRS-2211 10 μ M y PPADS 30 μ M , antes de ser estimuladas con 2MeSADP 1 μ M durante 10 min, manteniéndose la presencia de los antagonistas durante este tiempo de estimulación. Los controles en presencia de estos tres antagonistas por si solos no supusieron cambios significativos con respecto a las células no estimuladas (100% valor control) salvo en el caso del MRS-2211 mostrado en la figura. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. El panel superior muestra un experimento representativo de cada condición. Los datos se analizaron por medio de los test estadísticos de Dunnett y Tukey considerándose significativos estadísticamente a * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Resultados

en neuronas granulares, haciendo un estudio comparativo de la expresión de los tres subtipos de receptores P2Y que responden a ADP. En trabajos previos de nuestro grupo, y antes de que se clonara el receptor P2Y₁₃, ya se había podido detectar la presencia de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ en neuronas granulares en cultivo a nivel de RNA mensajero (Hervas y cols., 2003). De acuerdo con estos resultados previos, mediante experimentos de RT-PCR se detectaron niveles significativos de RNAm para los tres receptores de ADP, P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, como se muestra en la figura 4A.

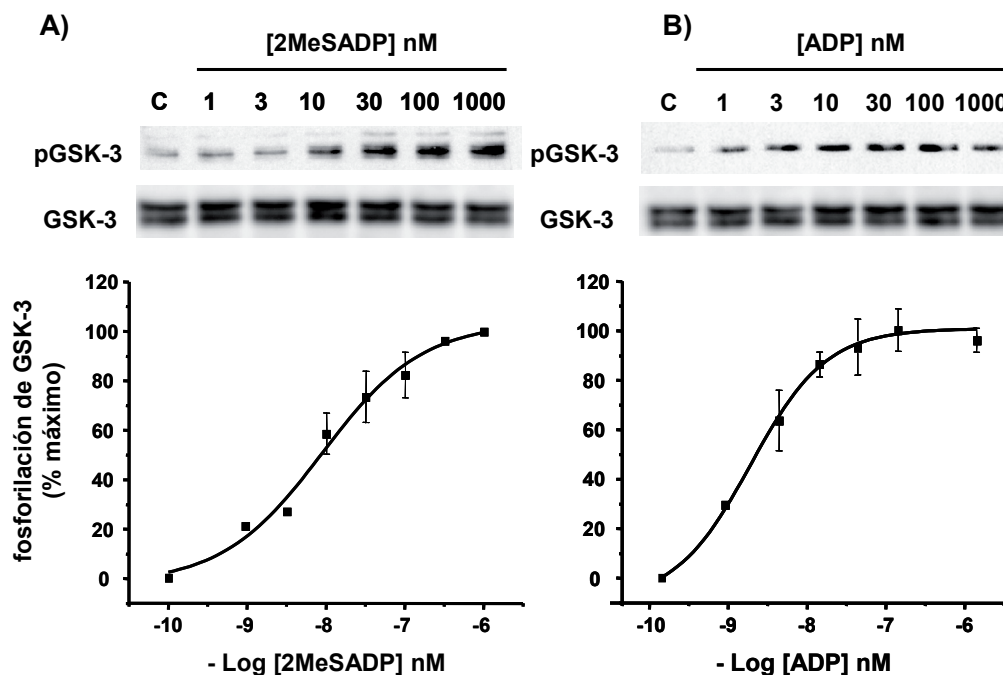


Figura 3. Curvas dosis respuesta para el 2MeSADP y el ADP. Las neuronas granulares de cerebelo se estimularon con concentraciones crecientes de 2MeSADP y ADP A) y B), respectivamente durante 10 min. Los resultados se normalizaron con respecto a la máxima respuesta ejercida por el 2MeSADP y el ADP a una concentración de 1 μ M (100%) y las curvas se ajustaron por medio del análisis Boltzmann. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. Siendo las bandas de Western Blot de la parte superior de la figura, las correspondientes a un experimento representativo.

Como la detección del RNAm no implica necesariamente la presencia de la proteína, se procedió a la detección de los receptores por medio de experimentos de inmunocitoquímica y de Western Blot, dado que ahora se dispone de anticuerpos comerciales específicos para cada uno de dichos receptores. La figura 5B muestra las bandas específicas de 45 y 65-37 kD correspondientes al tamaño esperado para los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃, respectivamente. Aunque la banda obtenida para el receptor P2Y₁₂ también parece ser específica, la señal es muy débil e indica un grado de expresión muy bajo y poco significativo.

Resultados similares se obtuvieron en los experimentos de inmunocitoquímica, en los que se observaron marcajes significativos para los receptores tipo P2Y₁ y P2Y₁₃, mientras que el marcaje del receptor P2Y₁₂ resultó ser muy débil y semejante al obtenido al utilizar su péptido control, revelando la naturaleza inespecífica del mismo (figura 4C).

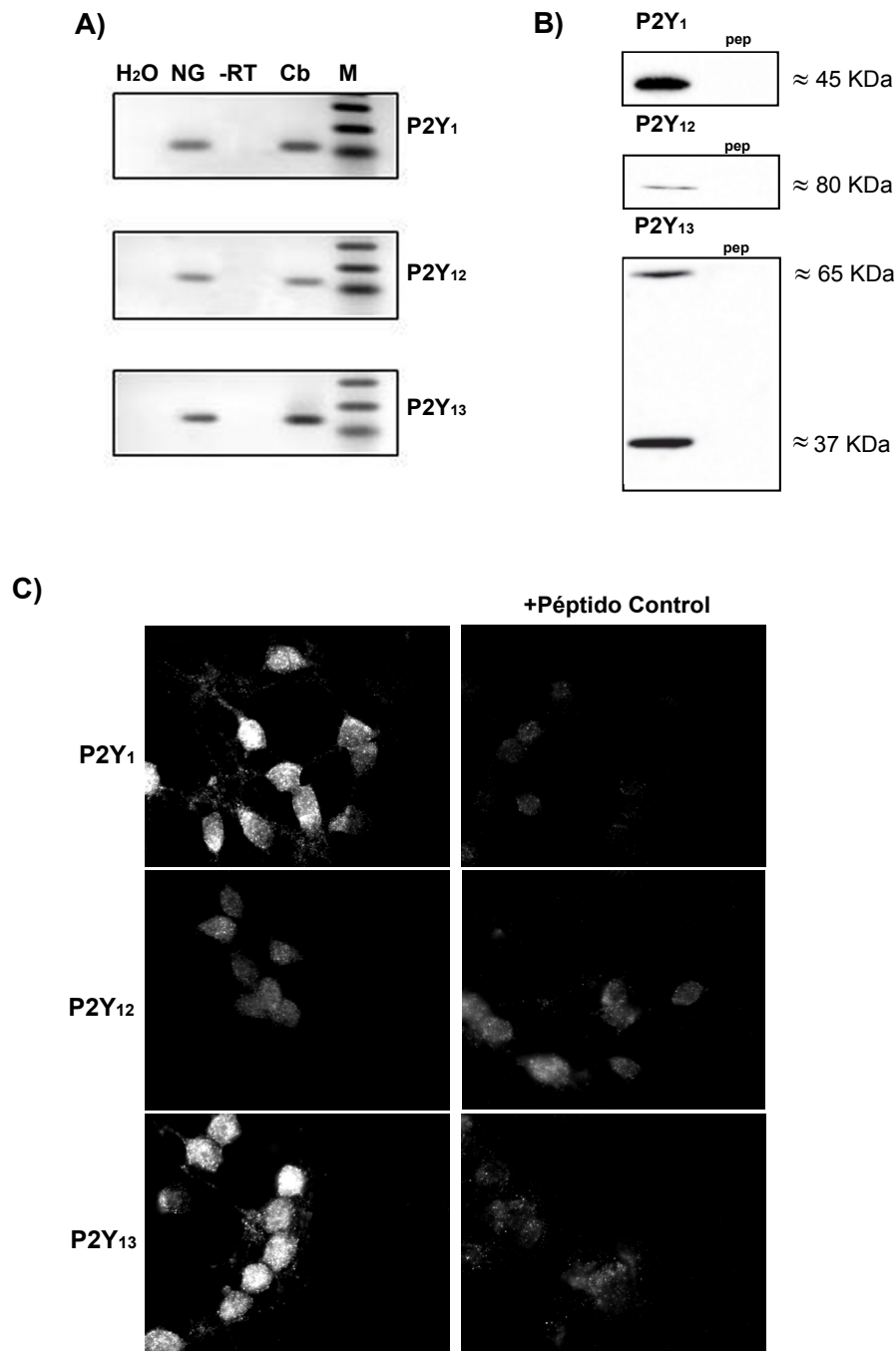


Figura 4. Expresión de distintos receptores de ADP P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, en neuronas granulares de cerebelo.

A) Experimentos de expresión de los receptores por RT-PCR. Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% y fueron visualizadas por medio de tinción con SYBR Gold (como se describe en Material y Métodos apartado 2.3). La banda para los receptores P2Y se situó alrededor de las 150 pares de bases y se amplificaron tanto de neuronas granulares de cerebelo en cultivo (GN) como de extractos totales de RNA de cerebelo de rata (Cb) que se empleó como control positivo de expresión. No se observaron productos de amplificación cuando se llevaron a cabo experimentos en paralelo en ausencia de la transcriptasa inversa (-RT), o en ausencia de molde (H₂O). M: Patrón de DNA de 100 bp. **B)** Experimentos de expresión de los receptores de ADP por Western Blot. Se utilizaron anticuerpos específicos para los receptores de ADP, P2Y₁ (1:200) P2Y₁₂ (1:200) y P2Y₁₃ (1:200) de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.4.3 de Material y Métodos. Las bandas obtenidas muestran un tamaño de 45, 80 y 65/37 KDa para los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, respectivamente lo que está de acuerdo con lo descrito en la bibliografía para estos receptores. Donde se indica (pep), cada uno de los anticuerpos se preincubó durante 1 hora con su correspondiente péptido control, antes de realizar la incubación de las muestras. **C)** Expresión de los receptores de ADP por inmunocitoquímica. Las neuronas granulares se incubaron con los anticuerpos específicos P2Y₁ (1:100) P2Y₁₂ (1:100) y P2Y₁₃ (1:50), y se revelaron con anticuerpos secundarios marcados con Cy3. Donde se indica (pep), cada uno de los anticuerpos se preincubó durante 1 hora con su correspondiente péptido control, antes de realizar la incubación de las muestras.

Resultados

Considerado en conjunto, estos resultados confirman la expresión de un receptor tipo P2Y₁₃ en neuronas granulares de cerebelo y que podría ser el responsable de las respuestas mediadas por el agonista 2MeSADP sobre la fosforilación de la proteína GSK3, de acuerdo con el perfil farmacológico observado.

1.1.3.- Vías de señalización activadas por el 2MeSADP en neuronas granulares.

A continuación se llevaron a cabo estudios para profundizar en el mecanismo de acción del 2MeSADP sobre la fosforilación de la proteína GSK3. Para ello, se analizaron dos posibles vías de señalización intermedias, por un lado la vía de la PI3K/Akt y por otro la vía de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK), para determinar si eran las cascadas de señalización previas a la fosforilación de la GSK3. En estos experimentos se utilizó el IGF-I, un importante factor de supervivencia, como control positivo de la activación de la vía PI3K/Akt/GSK3 en neuronas granulares.

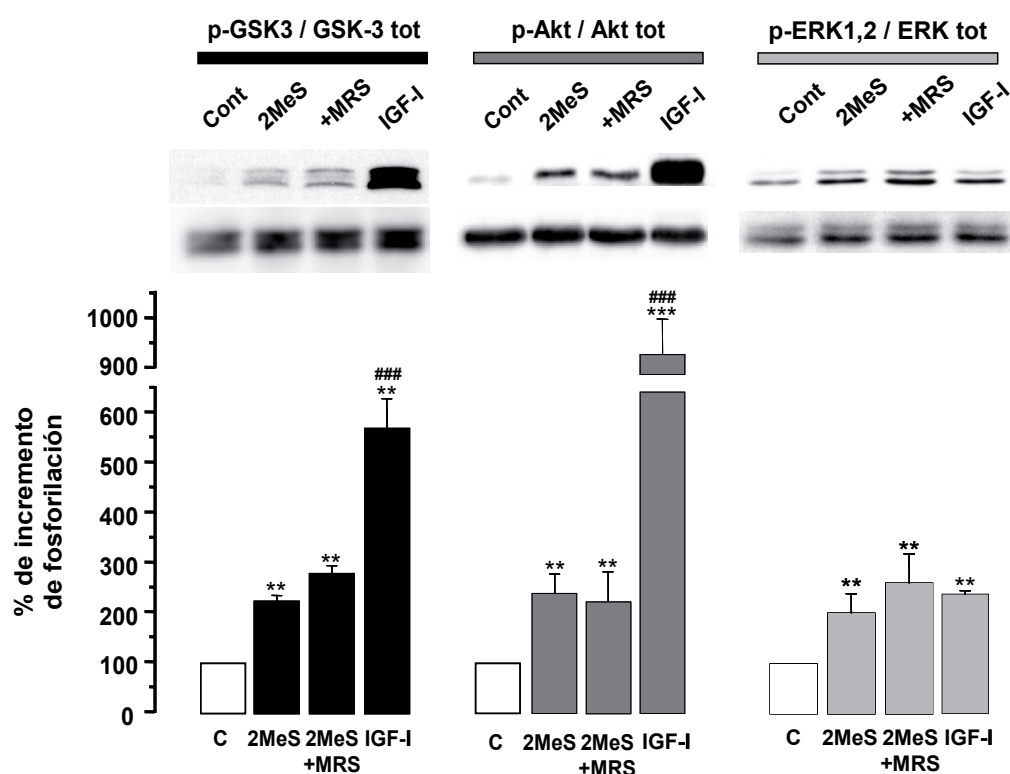


Figura 5. Efecto del 2MeSADP sobre la fosforilación de la Akt y las ERK-1/2 en neuronas granulares de cerebelo. La fosforilación y activación de las proteínas Akt y ERK-1/2 por parte del 2MeSADP se analizó empleando usando anticuerpos específicos que reconocen las formas fosforiladas de estas dos proteínas, Akt en sus residuos de Thr308, y ERK en Thr202 y Tyr204. Las células fueron estimuladas con 2MeSADP 1μM, en presencia o ausencia de MRS-2179 10μM, y con IGF-I 50ng/mL durante 10 minutos. También se evaluaron en los mismos extractos los niveles de fosforilación de la GSK3. Los histogramas muestran el porcentaje de incremento de fosforilación con respecto a las células no estimuladas (100% valor control) y se obtuvieron normalizando los valores densitométricos de la fosfo-GSK3, fosfo-Akt y fosfo-ERK-1/2 con respecto a los valores totales de cada una de esas proteínas. Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los valores control sin estimular y como # cuando el tratamiento con IGF-I se evaluó con respecto al tratamiento con 2MeSADP ± MRS-2179.

Al igual que lo observado para la GSK3, el 2MeSADP fue capaz de inducir la fosforilación y, en este caso activación, de ambas vías, tanto de la Akt (en su residuo de Thr308) como de las ERK1/2 (en sus residuos de Thr202 y Tyr 204). Estos efectos se mantuvieron en presencia del antagonista del receptor P2Y₁, el MRS-2179 (figura 5), indicando que ambas vías podrían ser las que convergieran en la GSK3. Como era esperable, el IGF-I resultó ser mucho más potente que el 2MeSADP en la fosforilación de las proteínas Akt y GSK3, mientras que en el caso de las ERK1/2, los niveles de fosforilación fueron semejantes para ambos agonistas.

Para concluir qué vía era la que mediaba los efectos del 2MeSADP sobre la GSK3, se llevaron a cabo nuevos análisis utilizando inhibidores específicos de proteínas de transducción de señales (figura 6). Primero se analizó el efecto de la toxina *pertussis*, en presencia de la cuál (10 ng/mL durante toda la noche), se abolió completamente el efecto del 2MeSADP sobre la fosforilación de la GSK3, confirmando la participación necesaria de un receptor de ADP acoplado a proteínas G_i/G_o, como es el caso del receptor P2Y₁₃ (Hollopeter y cols., 2001), y que estaría de acuerdo con el perfil farmacológico descrito anteriormente.

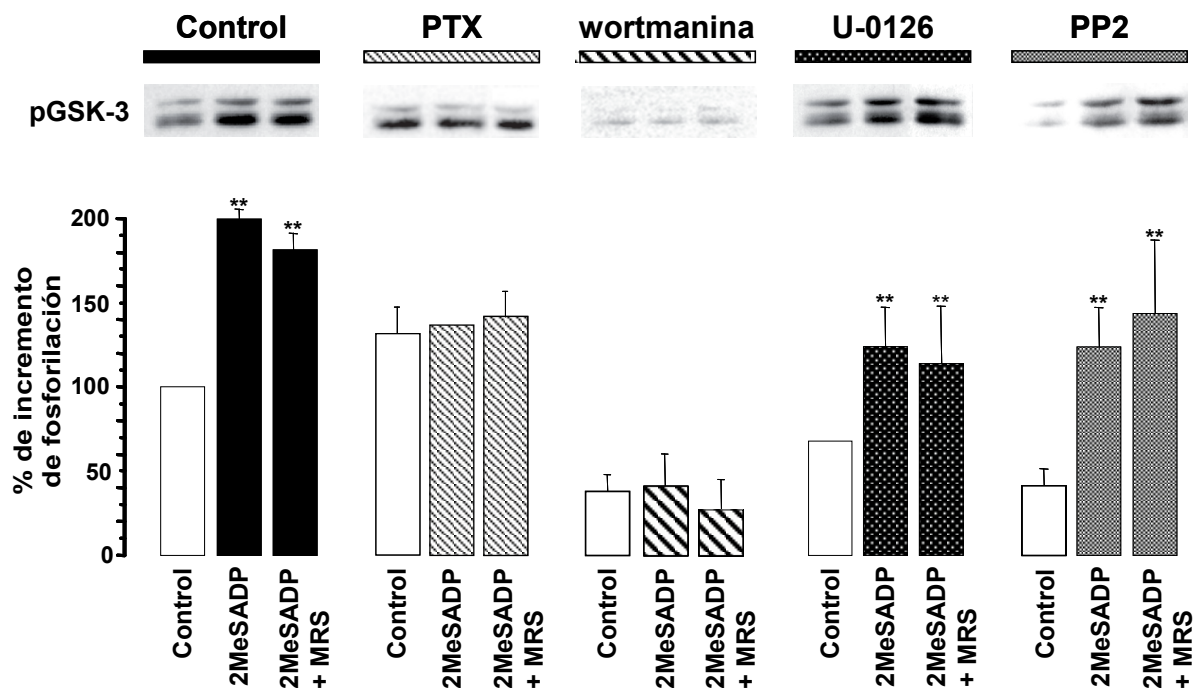


Figura 6. Efecto de los inhibidores de las principales vías de señalización sobre la fosforilación de la GSK3 inducida por 2MeSADP en neuronas granulares de cerebelo. Las neuronas granulares en cultivo se sometieron a diferentes tratamientos: incubación durante toda la noche con 10 ng/mL de *toxina pertussis*, y 30 minutos de incubación con los inhibidores de señalización (wortmanina 1μM, U-0126 10μM, y PP-2 1μM). Seguidamente las células fueron estimuladas con 2MeSADP 1μM en presencia y ausencia de MRS-2179 10μM durante 10 min, manteniéndose los inhibidores durante la estimulación. Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los valores control sin estimular.

También fue utilizado el inhibidor de la PI3K, la wortmanina (1 μ M), que inhibe la vía de señalización de la PI3K en las neuronas granulares y que bloqueó completamente el efecto del 2MeSADP. Por el contrario el inhibidor U-0126 de la proteína MEK-1, quinasa responsable de la activación de las ERK1/2, no supuso cambio alguno en la fosforilación observada sobre la GSK3 con respecto a los experimentos control (figura 6). Estos datos indicaban que la fosforilación de la GSK3 inducida por el 2MeSADP estaba siendo principalmente mediada por la vía de señalización de la PI3K/Akt, aunque no se podía descartar al cien por cien una posible interacción con la vía de señalización de las proteínas ERK.

Por último, las células fueron tratadas con el inhibidor de las src-tirosina quinasas, PP-2, lo que supuso un descenso importante de los niveles basales de fosforilación de la GSK3 con respecto al control, aunque el efecto neto producido por la estimulación con 2MeSADP se mantuvo en presencia y ausencia del antagonista MRS-2179 (figura 6). Por tanto, la intermediación de las src-tirosina quinasas en el efecto del 2MeSADP, o la posible interacción debido a su activación endógena en las neuronas granulares, fueron descartados por medio de este tratamiento. Es importante mencionar en este punto, que ninguno de los tratamientos que se describen en la figura 6 supuso alteración alguna en la viabilidad de las neuronas granulares.

1.1.4.- Efecto del 2MeSADP sobre la actividad GSK3 en neuronas granulares.

Inhibición de la actividad quinasa de la GSK3 por 2MeSADP

Esta experimentalmente demostrado que la fosforilación de la GSK3 en sus residuos de serina 21/9 (para las isoformas α y β , respectivamente) lleva asociada una inhibición de su actividad catalítica hacia sus sustratos (Frame y Cohen, 2001) (Cross y cols., 1995) (Chin y cols., 2005). Para comprobar esta posibilidad, en nuestro modelo, se determinó la actividad quinasa de la GSK3 mediante un ensayo “in vitro” en el que se medía el nivel de fosforilación de un sustrato específico de la GSK3, el péptido sintético GS-1, derivado de la glucógeno sintasa. Estos ensayos se realizaron en células que habían sido estimuladas con 2MeSADP, en presencia y ausencia de MRS-2179, y se compararon estos niveles con las células control sin estimular. Como se muestra en la figura 7A, los niveles de fosforilación del péptido GS-1 en los extractos celulares control eran de $631 \pm 37,28$ pmolP/mg/min. Tras el tratamiento con 2MeSADP se observó un descenso significativo hasta $450,73 \pm 51,9$ y $431,73 \pm 16,6$ pmolP/mg/min, en ausencia y presencia de MRS-2179, respectivamente, indicativo de una disminución en la actividad catalítica de la GSK3.

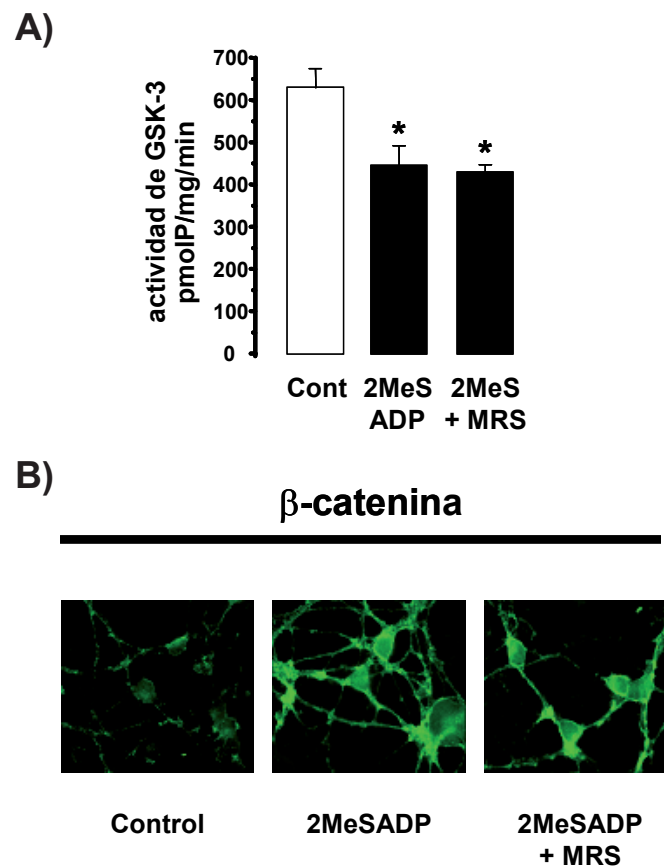


Figura 7. Efecto del 2MeSADP sobre la actividad catalítica de la proteína GSK3 en neuronas granulares de cerebelo. **A)** Las neuronas granulares en cultivo fueron incubadas durante 5 min en presencia y ausencia de MRS-2179 10 μ M, tras esto se estimularon con 2MeSADP 1 μ M durante 10 min en presencia continua del antagonista. Los extractos celulares obtenidos se sometieron a una reacción de fosforilación empleando el péptido GS-1, sustrato específico de la GSK3, y se evaluaron los niveles de fosforilación del péptido como se describe en el apartado de Material y Métodos (apartado 2.7). Los valores se expresan en pmol de fosfato incorporados por mg de proteína por minuto y son la media \pm SEM de tres experimentos llevados a cabo por triplicado. **B)** Imágenes de fluorescencia de una tinción inmunocitoquímica para β -catenina en neuronas granulares de cerebelo en cultivo. Las neuronas se estimularon con 2MeSADP 1 μ M durante 10 minutos, en presencia o ausencia de incubación previa con MRS-2179 10 μ M durante 5 min. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada a nivel de los somas de las neuronas granulares de cerebelo, usando el software Lucida, y se observaron incrementos significativos en las células estimuladas con 2MeSADP con respecto a los niveles basales. Se analizaron entre 150 y 200 células para cada condición en tres cultivos diferentes.

Además del sustrato sintético GS-1, se analizó la actividad quinasa de la GSK3 sobre uno de sus sustratos endógenos mejor conocidos, la β -catenina, cuyos niveles se detectaron mediante inmunocitoquímica. Cuando la β -catenina es fosforilada por la GSK3, es marcada para su ubiquitinización y su degradación en el proteasoma, mientras que en situaciones en las cuáles la actividad catalítica de la GSK3 es inhibida, la β -catenina es capaz de estabilizarse y acumularse en el citosol, pudiendo translocarse al núcleo (Frame y Cohen, 2001) (Coyle-Rink y cols., 2002). Como se muestra en la figura 7B, las inmunotinciones llevadas a cabo con el anticuerpo específico para la β -catenina, muestran un nivel de intensidad mayor en las células estimuladas con 2MeSADP, en presencia o ausencia del antagonista MRS-2179,

incrementándose esta intensidad de marcaje en un $80\% \pm 12$ en el primer caso, y un $106\% \pm 8$ en el segundo. Este aumento en la intensidad de marcaje indican un aumento de los niveles citosólicos de la β -catenina y su consiguiente estabilización debido a una disminución en la actividad catalítica de la proteína GSK3. En estos experimentos también pudo observarse un aparente incremento de marcaje de la β -catenina en núcleo aunque en una forma muy difusa.

Translocación nuclear de la β -catenina inducida por el 2MeSADP.

Con el fin de confirmar si ese aparente incremento en la región nuclear observado en las inmunotinciones de la figura 7B se correspondía en realidad con un aumento de los niveles de la proteína β -catenina en núcleo, se llevaron a cabo experimentos de Western Blot para detectar y cuantificar esta proteína en extractos nucleares de neuronas granulares control y estimuladas con 2MeSADP, en presencia y ausencia de MRS-2179, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos 2.4.

Las células se sometieron a diferentes períodos de tiempo de estimulación con 2MeSADP. Se observaron incrementos significativos en los niveles de β -catenina en núcleo con tan solo 10 minutos de incubación con 2MeSADP, y la presencia en el medio del antagonista MRS-2179 no supuso alteración alguna de estos resultados (figura 8A). Estos incrementos obtenidos en la fracción nuclear se mantuvieron en estimulaciones mucho más mantenidas de 1h y 6 h (figuras 8A y 8B). Como se muestra en la figura 8A la translocación al núcleo de la proteína β -catenina fue totalmente abolida cuando las células se incubaron en presencia de la wortmanina, el inhibidor de la PI3K, confirmando que esta es la etapa intermedia clave en la señalización del 2MeSADP hacia la proteína GSK3.

Teniendo en cuenta que se ha descrito que el factor IGF-I también es capaz de inducir la estabilización y translocación al núcleo de la β -catenina (Desbois-Mouthon y cols., 2001) (Papkoff y Aikawa, 1998), se llevaron a cabo experimentos comparativos a distintos tiempos de estimulación entre el 2MeSADP y el factor de crecimiento. Como se muestra en la figura 8B, el agonista nucleotídico fue capaz de incrementar los niveles nucleares de β -catenina a tiempos mucho más cortos de estimulación en comparación con el IGF-I. El efecto del 2MeSADP es prácticamente máximo tras 10 minutos de estimulación permaneciendo inalterado a tiempos de incubación prolongados de 1 y 6 horas, respectivamente. En cambio, el factor de crecimiento IGF-I necesita períodos de tiempo mucho más largos, no siendo visible un aumento significativo de los niveles de β -catenina hasta pasada una hora de estimulación, alcanzando tras 6h los niveles máximos, y siendo éstos semejantes a los obtenidos tras la estimulación con el agonista nucleotídico 2MeSADP.

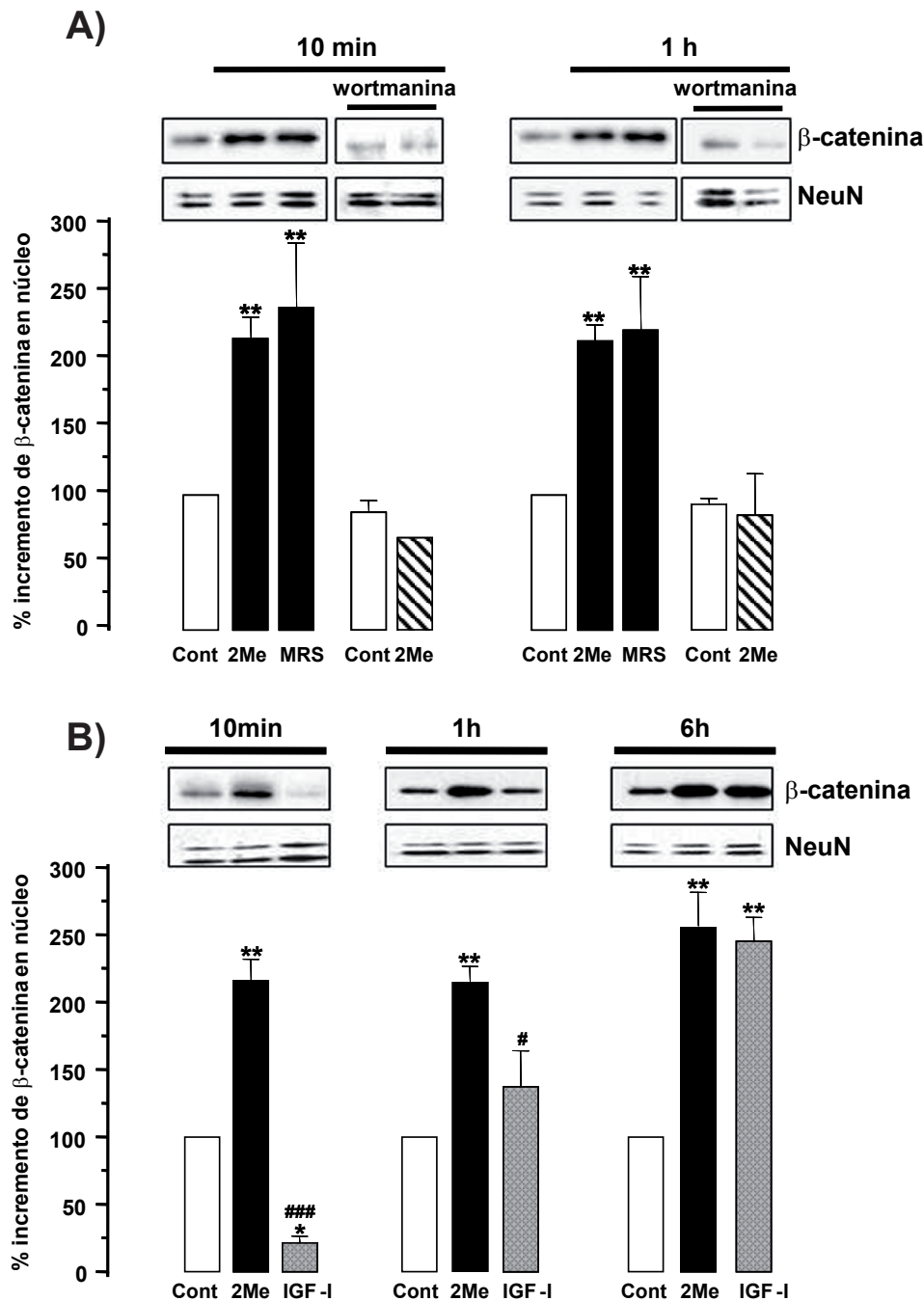


Figura 8. Efecto del 2MeSADP sobre la translocación nuclear de la β -catenina. A) y B): Las células en cultivo fueron incubadas con 2MeSADP 1 μ M (en presencia y ausencia de MRS-2179 10 μ M) y 50ng/mL de IGF-I durante varios períodos de incubación de 10 min., 1 h (A) y (B), y 6 h (B), recogiendo posteriormente las fracciones nucleares como se describen en Material y Métodos (apartado 2.4). En los experimentos llevados a cabo en presencia del inhibidor de la PI3K wortmanina, las células se preincubaron durante 30 minutos con 1 μ M del compuesto antes de añadir el agonista nucleotídico. El análisis de los niveles de β -catenina en las fracciones nucleares se llevaron a cabo por inmunotransferencia como esta descrito en el apartado de Materiales y Métodos (apartado 2.4). Los valores representan el porcentaje de incremento con respecto a las células no estimuladas (100% valor control) y se obtuvieron mediante la normalización de los valores de β -catenina obtenidos por densitometrado con respecto a los valores de Neu-N (tomado como marcador nuclear). Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. Los datos se consideraron significativos estadísticamente a * p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001 cuando se tomaron como referencia los valores control de β -catenina (células no estimuladas) para cada tiempo de incubación (10min, 1h y 6h) o para cada tratamiento (con o sin wortmanina) y a # p < 0.05 y ### p < 0.001 cuando se utilizó como referencia el efecto del 2MeSADP.

En este primer apartado de Resultados podemos concluir que en las neuronas granulares de cerebelo, el 2MeSADP está actuando sobre un receptor nucleotídico tipo P2Y₁₃, que está acoplado a la fosforilación e inhibición de la proteína GSK3 a través de una vía dependiente de la ruta PI3K/Akt. Este mecanismo de señalización implica la translocación nuclear del regulador transcripcional β -catenina, indicando que este receptor nucleotídico puede tener un papel relevante en la regulación de la expresión génica.

1.2.- Señalización de los receptores nucleotídicos P2X de tipo ionotrópico acoplada a la GSK3 en neuronas granulares de cerebelo.

1.2.1.- Fosforilación de la proteína GSK3 mediada por agonistas nucleotídicos de receptores tipo P2X en neuronas granulares. Efecto del BzATP.

Una vez estudiado el efecto de los receptores metabotrópicos de nucleótidos sobre la fosforilación y actividad de la GSK3 decidimos investigar si también los receptores ionotrópicos (P2X) presentes en las neuronas granulares podrían estar acoplados a esta vía de señalización.

De igual forma que en el caso de los receptores metabotrópicos, la primera aproximación al estudio del efecto de los receptores P2X sobre la GSK3 se realizó haciendo un primer barrido con agonistas selectivos para distintos tipos de receptores P2X, cuya expresión en las neuronas granulares de cerebelo había sido estudiada en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Hervas y cols., 2003) (Hervas y cols., 2005). El receptor P2X7 era uno de los receptores P2X que presentaba mayor nivel de expresión en estas células, junto con los receptores P2X1 y P2X3. Ya se habían descrito funciones específicas para ellos a nivel de respuestas de calcio y su señalización hacia la fosforilación y activación de la proteína calmodulina quinasa II (CaMKII) (Leon y cols., 2006) (Leon y cols., 2008). En todas estas acciones, la contribución del receptor P2X7 resultó ser mucho mayor que la de los otros receptores ionotrópicos P2X1 y P2X3.

Para estudiar el efecto de la activación del receptor P2X7 sobre la GSK3 se empleó el agonista BzATP. Este compuesto es bastante selectivo para el receptor P2X7, pero también puede activar otros P2X (Bianchi y cols., 1999). Por ello, para potenciar las acciones del BzATP sobre el receptor P2X7, los experimentos de fosforilación de la GSK3 se realizaron de manera rutinaria en un medio en ausencia de Mg²⁺ (Locke sin Mg²⁺). Ya que una de las características diferenciales del P2X7 es su sensibilidad a la inhibición por cationes divalentes (Virginio y cols., 1998b). En estas condiciones, y como se muestra en la figura 9, el BzATP indujo incrementos en la fosforilación de los residuos de serina de la GSK3 de entre 4 y 5 veces por encima de los niveles basales.

De igual manera, tanto el agonista α,β -meATP, selectivo para los receptores P2X1 y P2X3, como el agonista general endógeno ATP, produjeron incrementos de fosforilación sobre la GSK3 semejantes a los obtenidos por el BzATP (figura 9). Es interesante destacar que el

efecto del ATP aumentaba a medida que se incrementaba su concentración en el rango mM. Estos resultados estarían de acuerdo con que, tanto el BzATP, como el ATP a concentraciones elevadas, estuvieran activando preferentemente un receptor tipo P2X7 en las neuronas granulares, para el que se ha descrito que presenta una afinidad para el ATP de entre 10 y 100 veces menor que para el BzATP en ausencia de Mg^{2+} (North, 2002) (Young y cols., 2007). Dado que el ATP puede estar activando otros receptores de nucleótidos P2X y P2Y, y que a $100\mu M$ ya estarían totalmente saturados, para evitar posibles interferencias, se prefirió continuar usando el agonista BzATP para el estudio de las acciones mediadas por la activación del receptor P2X7.

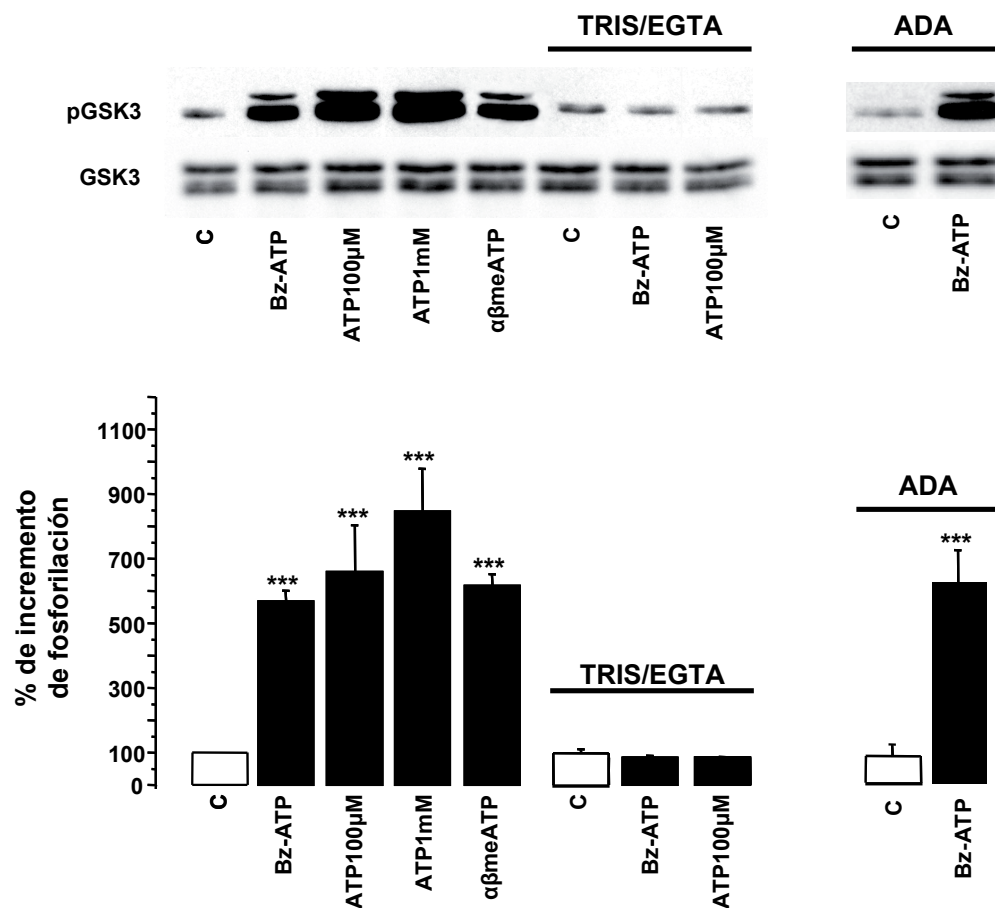


Figura 9. Efecto de diferentes agonistas nucleotídicos de receptores ionotrópicos sobre la fosforilación de la GSK3. Las neuronas granulares en cultivo se estimularon con varios agonistas nucleotídicos: BzATP $100\mu M$, de ATP $100\mu M$ y $1mM$, y $\alpha\beta$ -meATP $100\mu M$ durante 10 min. De la misma forma se estimularon las células en cultivo con BzATP y ATP $100\mu M$ en presencia de la mezcla quelante de TRIS/EGTA y con BzATP en presencia de Adenosina deaminasa ($1U/mL$). Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes, considerándose significativos estadísticamente a * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

La naturaleza ionotrópica de la respuesta del ATP y BzATP quedó demostrada con la abolición total de los incrementos de fosforilación observados en la GSK3 al retirar del medio el calcio extracelular, por medio de la mezcla quelante de EGTA/Tris. Además, la posible interferencia del sistema de receptores de adenosina por la adenosina formada a partir de la hidrólisis extracelular de los nucleótidos, fue totalmente descartada, ya que los efectos de

Resultados

los agonistas nucleotídicos sobre la fosforilación de la GSK3 se mantenían en presencia de adenosina deaminasa (figura 9).

Como se puede observar en la figura 10A, la fosforilación de la GSK3 inducida por BzATP era una respuesta mantenida, ya que el incremento ejercido por el BzATP alcanzaba sus niveles máximos a los 5-10 min de estimulación, y seguía manteniéndose elevado en tiempos más prolongados de hasta una hora de estimulación. En cuanto a la curva dosis-respuesta efectuada con este agonista, se observaron incrementos significativos en la fosforilación de la GSK3 con tan sólo concentraciones de 25 μ M de BzATP, obteniéndose los efectos máximos a 300 μ M (figura 10B). El valor de la EC_{50} obtenido en estos experimentos fue de $20,77 \pm 4,28 \mu$ M, lo que está de acuerdo con el rango descrito para un receptor $P2X_7$ de rata (Young y cols., 2007). A partir de este momento, en los experimentos realizados posteriormente, se emplearon tiempos de estimulación de 10 min y concentraciones de BzATP de 100 μ M.

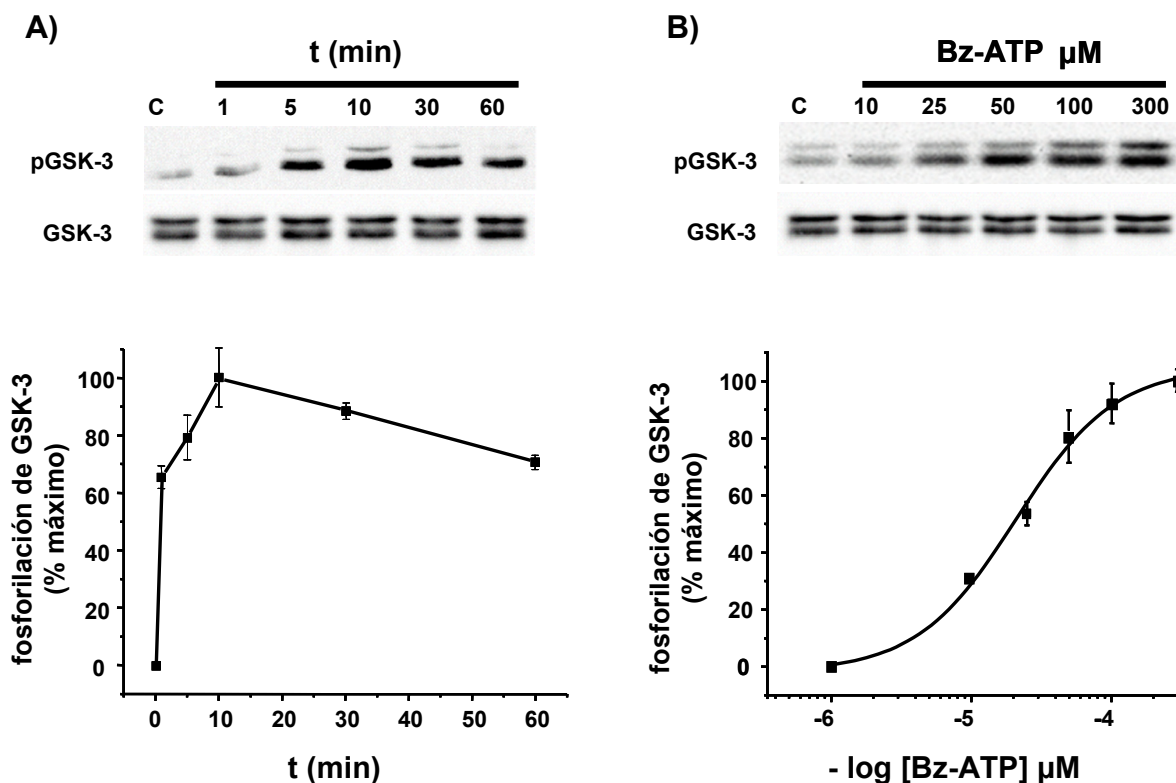


Figura 10. Función tiempo y función concentración de la fosforilación de la GSK3 ejercida por el BzATP en neuronas granulares. Las neuronas granulares en cultivo fueron estimuladas con BzATP 100 μ M a diferentes periodos de incubación (A) o a diferentes concentraciones durante 10 minutos (B). Los resultados se normalizaron con respecto a la máxima respuesta ejercida por el BzATP. En B) la curva se ajustó por medio de análisis de Boltzmann. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. El panel superior muestra un experimento representativo de cada condición. Los datos se analizaron por medio del test de Dunnett considerándose significativos estadísticamente a * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

1.2.2.- Identificación del receptor P2X7 como responsable de la respuesta inducida por el BzATP sobre la fosforilación de la proteína GSK3 en neuronas granulares.

Para confirmar que el efecto del BzATP sobre la señalización de la GSK3 estaba mediado por un receptor tipo P2X7 en neuronas granulares se emplearon varios antagonistas de receptores P2X. Como se muestra en la figura 11A, tanto el antagonista específico para el receptor P2X7 de rata, BBG (Jiang et al., 2000), como el antagonista general de receptores nucleotídicos, PPADS (Jiang y cols., 2000a) (Hibell y cols., 2001), fueron capaces de inhibir el incremento de fosforilación sobre la GSK3 que se observaba al estimular las células con BzATP. En cambio, el TNP-ATP, antagonista que exhibe un valor de IC_{50} en el rango del nanomolar bajo para los receptores P2X1 y P2X3 (Virginio y cols., 1998b), no tuvo ningún efecto sobre la respuesta mediada por el BzATP (figura 11A), pudiéndose descartar la posibilidad de que el BzATP estuviera actuando a través de los dos receptores anteriormente mencionados.

Es interesante destacar que aunque los antagonistas BBG y PPADS bloqueaban la respuesta de BzATP, se podía observar un ligero incremento de los niveles basales de fosforilación de la proteína GSK3 con el uso de ambos antagonistas. Por ello, decidimos recurrir al empleo de antagonistas más específicos para el receptor P2X7. Durante la última etapa de realización de esta Tesis fueron desarrollados diversos antagonistas selectivos de los que se pudo disponer comercialmente (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007), como el A-438079. Este compuesto fue testado con el fin de obtener una prueba adicional de la implicación del receptor P2X7 en los efectos que estamos describiendo. Como se muestra en la figura 11B, el tratamiento con A-438079 también eliminó el incremento inducido por el BzATP sobre la fosforilación de la GSK3, sin aumentar de manera significativa los niveles basales, confirmando, por tanto, que el receptor que media las acciones efectuadas por el BzATP en neuronas granulares de cerebelo de rata, es un receptor P2X7.

Resultados

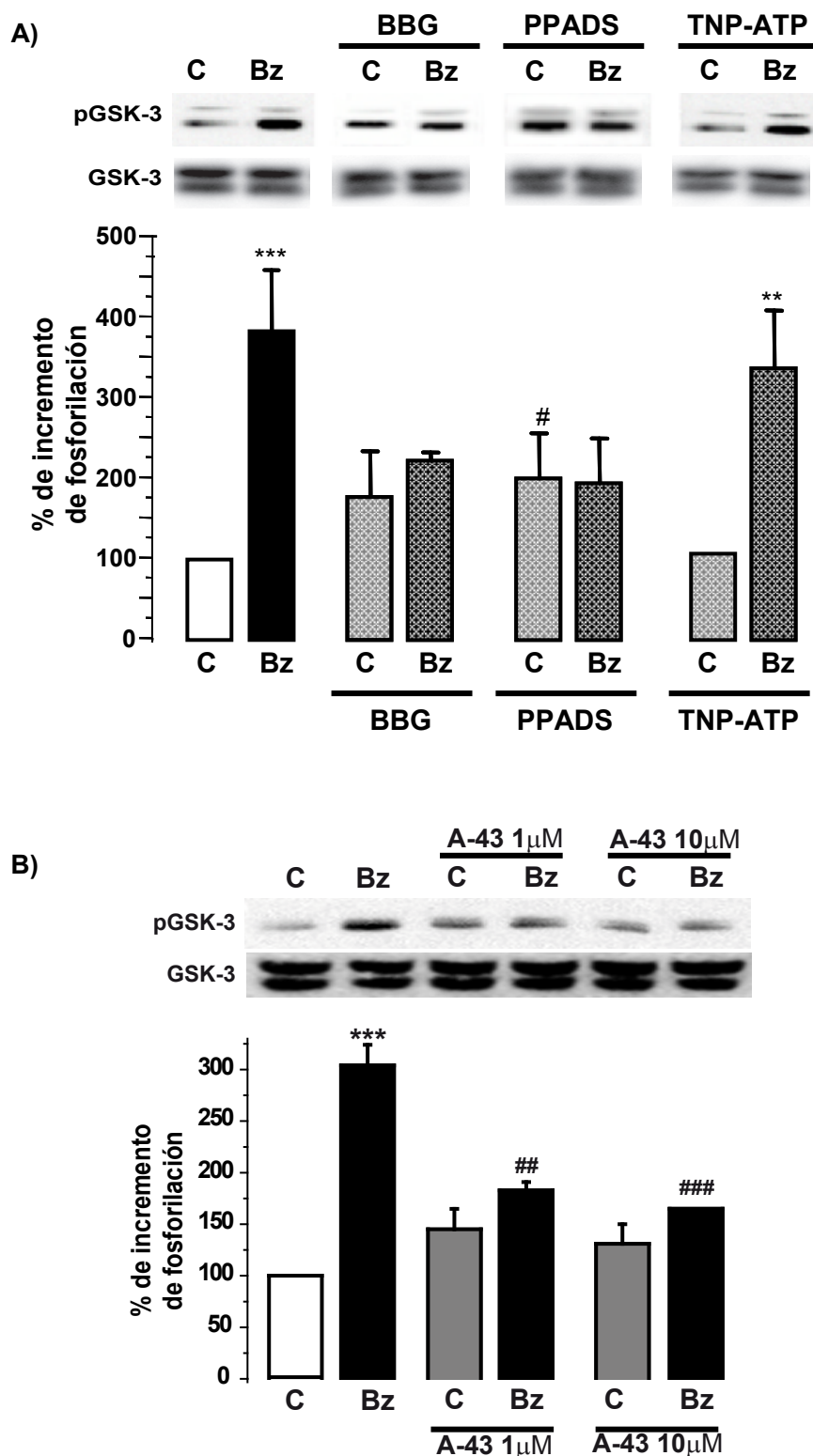


Figura 11. Efecto de distintos antagonistas nucleotídicos sobre la fosforilación de la GSK3 inducida por el BzATP. A) Las neuronas granulares en cultivo fueron estimuladas BzATP 100μM durante 10 min tras una incubación de 5 minutos con diferentes antagonistas: BBG 10μM, PPADS 30μM y TNP-ATP 2μM (A) y A-438079 1 y 10μM (B). Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes de diferentes cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los valores control en cada caso, y con # cuando se comparó los tratamientos con los antagonistas con las células no estimuladas.

1.2.3.- Mecanismo de señalización del BzATP en neuronas granulares.

Siguiendo la línea de investigación llevada a cabo en el apartado de los receptores metabotrópicos, el siguiente paso fue analizar qué cascada de señales era la que estaba implicada en la fosforilación de la GSK3 activada por BzATP. Teniendo en cuenta que la señal del BzATP era dependiente del calcio extracelular, nuestra primera elección fue analizar proteínas dependientes de calcio, como la calcio calmodulina kinasa II (CaMKII) y la proteína PKC. Con este fin utilizamos en primer lugar el inhibidor de la CaMKII, KN62, que aunque ha sido descrito como antagonista para el receptor P2X7 en humano y ratón (Humphreys y cols., 1998), no posee estas cualidades en el caso de la rata. Los niveles basales de fosforilación de la proteína GSK3 se vieron reducidos en presencia de este inhibidor, aunque el efecto neto del BzATP sobre la GSK3 no se vio alterado en absoluto, sugiriendo que la CaMKII no está implicada en el mecanismo de señalización que conduce desde el BzATP hacia la proteína GSK3 (figura 12A). Resultado diferente se obtuvo, en cambio, al estimular las células en presencia del inhibidor de PKCs, GF-I, que bloqueó completamente la fosforilación de la GSK3 ejercida por el BzATP, demostrando que esta proteína es un paso clave en la señalización activada por el receptor P2X7 (figura 12A).

El GF-I, a la concentración empleada, inhibe varios tipos de PKCs, tanto las dependientes de calcio como las PKCs atípicas. Para discriminar bien entre ambos subtipos, se empleó un inhibidor más específico de las PKCs dependientes de calcio, el Gö-6976, que presenta un valor de IC_{50} en el rango nM para las PKCs clásicas o convencionales. Como era de esperar, este compuesto tuvo el mismo efecto sobre las respuestas de BzATP que el inhibidor general GF-I. Esto unido al hecho de que el éster de forbol PDBu reprodujera niveles de fosforilación de la GSK3 similares a los obtenidos con el BzATP, y la ausencia de efecto del éster de forbol inactivo α PDD, confirma que en la cascada de señalización mediada por el BzATP está implicada una PKC dependiente de calcio (figura 12A).

A continuación se estudió la posible contribución de otras quinasas que podrían estar “upstream”/ por delante de la proteína GSK3. El inhibidor de las src-tirosina quinasas, el PP-2, redujo significativamente los niveles basales de la fosforilación de GSK3, pero no supuso alteración alguna del incremento ejercido por el BzATP. En cambio, el inhibidor de las MAP quinasas, el U-0126, incrementó por sí mismo los niveles basales de fosforilación de la GSK3 hasta valores que no fue capaz de superar el BzATP, de forma parecida a lo que se había observado para el agonista metabotrópico 2MeSADP (figura 12A). Este incremento en la fosforilación de la vía PI3K/Akt cuando las ERK están inhibidas ya se había descrito anteriormente en neuronas granulares. Por lo tanto, una posible participación o interacción entre las MAP quinasas y la GSK3 no puede ser descartada en vista de los resultados obtenidos en estos experimentos.

Resultados

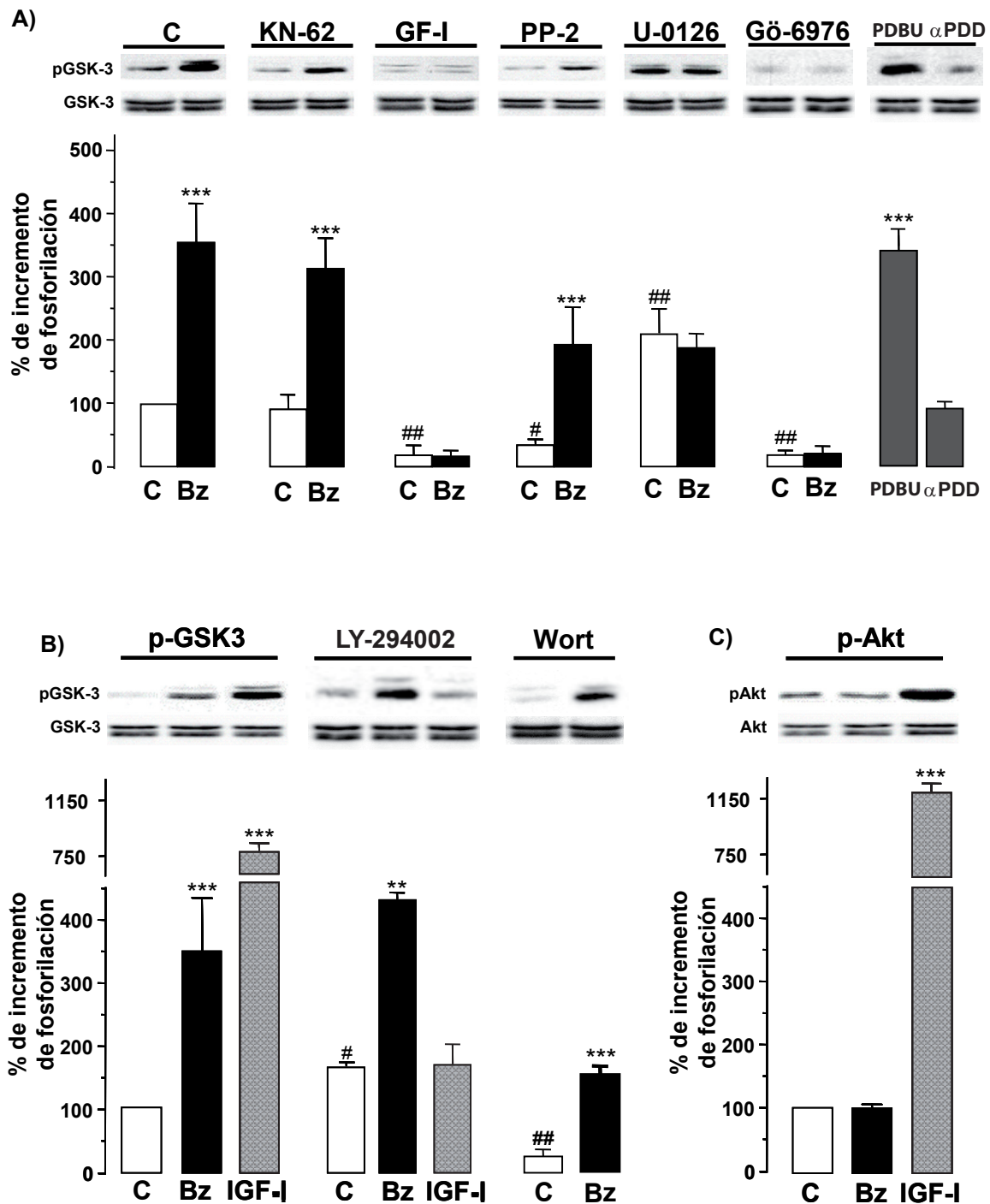


Figura 12. Efecto de varios inhibidores de las vías de señalización sobre la fosforilación de GSK3 inducida por el BzATP en neuronas granulares de cerebelo. A) y B) Las neuronas granulares en cultivo se sometieron a 20 min de incubación con los inhibidores: KN-62 10μM, GF-I 1μM, PP-2 1μM, U-0126 10μM, LY-294002 50μM, y wortmanina 1μM. Manteniéndose los inhibidores durante la estimulación con BzATP 100μM e IGF-I 50ng/ml durante 10 minutos. También se estimularon las células con PDBU y αPDD (200nM). C) Se evaluaron los incrementos de fosforilación de la proteína Akt tras estimular las células durante 10 min con BzATP 100μM e IGF-I 50ng/ml. Los histogramas muestran el porcentaje de incremento de fosforilación con respecto a las células no estimuladas (100% valor control) y se obtuvieron normalizando los valores densitométricos de las fosfo-proteínas con respecto a los valores totales. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media ± SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los valores control en cada caso, y con # cuando se comparó los tratamientos con los inhibidores con las células no estimuladas.

Como ya hemos comentado anteriormente la vía de señalización principal que conduce a la fosforilación de la GSK3 es la mediada por el eje PI3K/Akt. Para comprobar si existía implicación de este sistema en nuestro caso, se utilizaron dos inhibidores específicos de la PI3K, el LY-294002 y la wortmanina. Como se muestra en la figura 12B ambos inhibidores, usados a concentraciones en las que específicamente inhiben la PI3K en neuronas granulares (D'Mello y cols., 1997) (Miller y cols., 1997), no supusieron modificación alguna en el efecto neto mediado por el BzATP. De acuerdo con esto, el BzATP tampoco tuvo efecto en la fosforilación y activación de la proteína Akt (figura 12C), etapa inmediatamente posterior a la PI3K y que se activa por ella. De nuevo, como control positivo de la activación de esta vía se empleó el IGF-I, que sí incrementó de forma muy significativa, como era esperado, los niveles de fosforilación tanto de la GSK3 como de la Akt, siendo su efecto totalmente sensible a los dos inhibidores de la PI3K, confirmando que esta vía es la ruta principal utilizada por los factores tróficos para mediar sus acciones en las neuronas granulares de cerebelo de rata.

Todos estos resultados indican que el BzATP, estimulando un receptor P2X7, utilizaría una vía alternativa dependiente de PKC para mediar la fosforilación de la GSK3, mientras que la vía más caracterizada para inhibir la GSK3, la PI3K/Akt, quedaría en este caso al margen.

1.2.4.- Efecto protector del BzATP frente a la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K en neuronas granulares.

De los resultados mostrados en el apartado anterior, es importante destacar el hecho de que el BzATP sea capaz de fosforilar en sus residuos de serina a la proteína GSK3 a través de una ruta de señalización diferente a la usada por los factores tróficos. En esta vía alternativa participan activamente las PKCs, mientras que no interviene en el eje PI3K/Akt, lo que nos aportó la idea de la posible ventaja que supondría para las células la estimulación con BzATP en episodios en los que las vías normalmente activadas por los factores tróficos se encuentran comprometidas. En este sentido, está bien documentado el hecho de que la inhibición farmacológica de la PI3K, que simula estas condiciones de ausencia de señalización trófica, induce la muerte celular por apoptosis en las neuronas granulares (D'Mello y cols., 1997) (Miller y cols., 1997). Con esta información previa, utilizamos el inhibidor específico de la PI3K, el LY-294002, para inducir apoptosis en las neuronas granulares e investigar si derivaban efectos protectores para las células como consecuencia de la estimulación con BzATP.

Como se puede observar en la figura 13, en nuestras condiciones de cultivo, el tratamiento durante 24 horas con LY-294002 indujo muerte neuronal de manera dependiente de la concentración del inhibidor. El porcentaje de supervivencia fue estimado mediante el ensayo del MTT, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos 2.8.2. Está descrito que el aumento de muerte neuronal que induce el LY-294002 a medida que se aumenta su concentración en el tratamiento, coincide perfectamente con el grado de inhibición que ejerce

Resultados

sobre la actividad PI3K en neuronas granulares (D'Mello y cols., 1997) (Miller y cols., 1997). La estimulación previa con el BzATP fue capaz de prevenir parcialmente la muerte celular e incrementar la supervivencia en un porcentaje de $35 \pm 5 \%$ en todas las concentraciones a las que el LY-294002 fue utilizado. Teniendo en cuenta que estos experimentos de valoración de la supervivencia fueron realizados en medio de cultivo completo, se necesitaron concentraciones de $300\mu\text{M}$ de BzATP para obtener resultados más reproducibles. Como información adicional, se ha de indicar que no fueron necesarios largos períodos de incubación previa con el BzATP, ya que la magnitud del efecto neuroprotector no variaba cuando se realizan preincubaciones largas de 1 – 2 horas y cuando el agonista se añadía al mismo tiempo que el inhibidor de la PI3K. Por tanto, se estimó que una preincubación de 10 min con BzATP era suficiente para obtener resultados fiables en los siguientes experimentos.

Para comprobar la especificidad del efecto del LY-294002 en la inhibición de la actividad

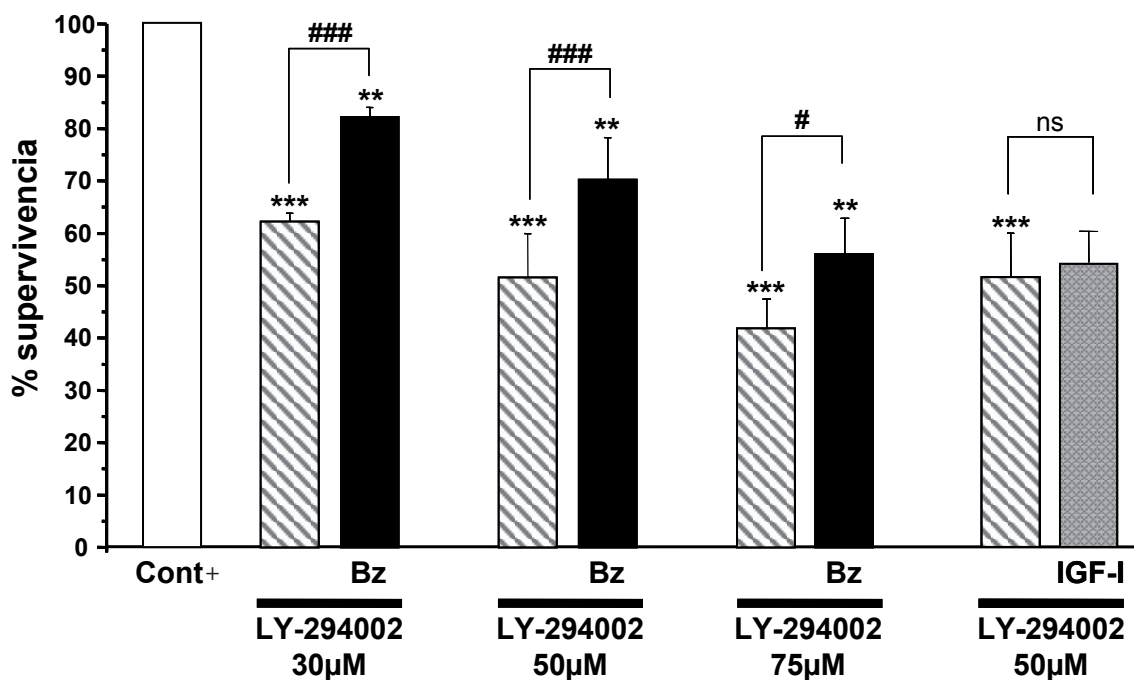


Figura 13. Efecto del tratamiento con el inhibidor de la PI3K, el LY-294002 en la supervivencia de las neuronas granulares. Efecto neuroprotector del BzATP. Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con BzATP $300\mu\text{M}$ ó IGF-I 50ng/mL durante 10 min y seguidamente se añadió el inhibidor LY-294002 a concentraciones de 30, 50 y $75\mu\text{M}$. Estos experimentos se realizaron rutinariamente en presencia de adenosina deaminasa (1U/mL). Los diagramas de barras muestran los porcentajes de supervivencia con respecto al control en medio completo (Control+). La viabilidad celular se evaluó 24 horas después por medio del ensayo del MTT como se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.8.2). Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia las células no tratadas, y con # cuando cada tratamiento con LY-294002 fue comparado en presencia o ausencia de BzATP o IGF-I.

de PI3K se utilizó el IGF-I. Como era esperable, no se observó efecto protector alguno de este factor, ya que el IGF-I ejerce sus acciones neuroprotectoras a través de la vía de señalización PI3K/Akt en las neuronas granulares. (D'Mello y cols., 1997) (Subramaniam y cols., 2005); (Yamagishi y cols., 2003).

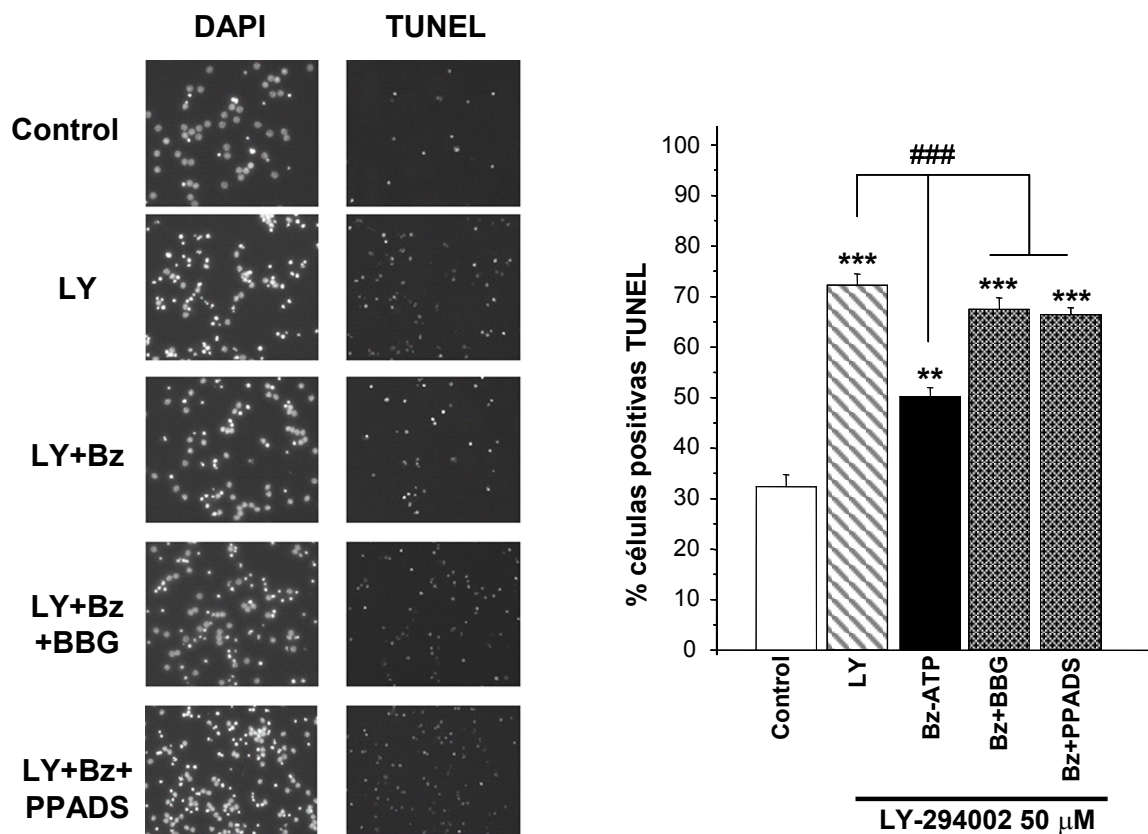


Figura 14. Experimentos de TUNEL para evaluar el nivel de apoptosis en las neuronas granulares de cerebelo tras la inhibición de la PI3K. Rescate por BzATP. Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas durante 5 min en presencia o ausencia de los antagonistas (BBG 10 μ M y PPADS 30 μ M), seguidamente las células fueron estimuladas durante 10 min con BzATP a 300 μ M antes de añadir al medio LY-294002 50 μ M. 24 horas después del tratamiento se llevó a cabo la cuantificación de los núcleos apoptóticos por medio de la reacción de TUNEL como se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.8.3). **A)** Imágenes de inmunofluorescencia de tinción con DAPI (izquierda) y tinción por TUNEL (derecha), obtenidas del mismo campo de neuronas granulares. La tinción con DAPI se empleó tanto para cuantificar el número total de núcleos en cada campo, como para realizar un seguimiento de la condensación y fragmentación de la cromatina que está asociada a los cambios morfológicos que se producen en el núcleo durante la apoptosis. Estos núcleos alterados morfológicamente se correspondían perfectamente con los marcados positivamente por la reacción de TUNEL **(B)**. Los histogramas representan el porcentaje de células marcadas positivamente por túnel con respecto al número total de células marcadas con DAPI. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. Los datos se analizaron por medio de los test de Dunnett y Tukey considerándose estadísticamente significativos a *** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$ cuando se tomó como referencia las células no tratadas, y a ### $p < 0.001$ cuando se tomó como referencia el efecto protector del BzATP.

Resultados

Con los resultados obtenidos hasta este momento se comprobó que el BzATP era capaz de incrementar la supervivencia celular de las neuronas granulares cuando la vía de la PI3K estaba inactiva. Para demostrar la naturaleza apoptótica de la muerte neuronal se llevaron a cabo experimentos de marcaje de TUNEL, en los que se evaluó el marcaje “in situ” de la fragmentación del DNA que acompaña a la apoptosis. En la figura 14 se muestra cómo el porcentaje de células marcadas positivamente como apoptóticas en los experimentos de TUNEL se incrementaron más de dos veces con respecto al control cuando el cultivo fue tratado con LY-294002 50 μ M durante 24 horas. El número de células apoptóticas disminuyó alrededor de un 30% cuando las células fueron estimuladas con BzATP. Es importante indicar que la estimación de los niveles de supervivencia obtenidos en estos experimentos de TUNEL fueron semejantes a los obtenidos en los experimentos realizados mediante el ensayo del MTT, confirmando la especificidad y validez de la medida de la muerte neuronal en ambos ensayos.

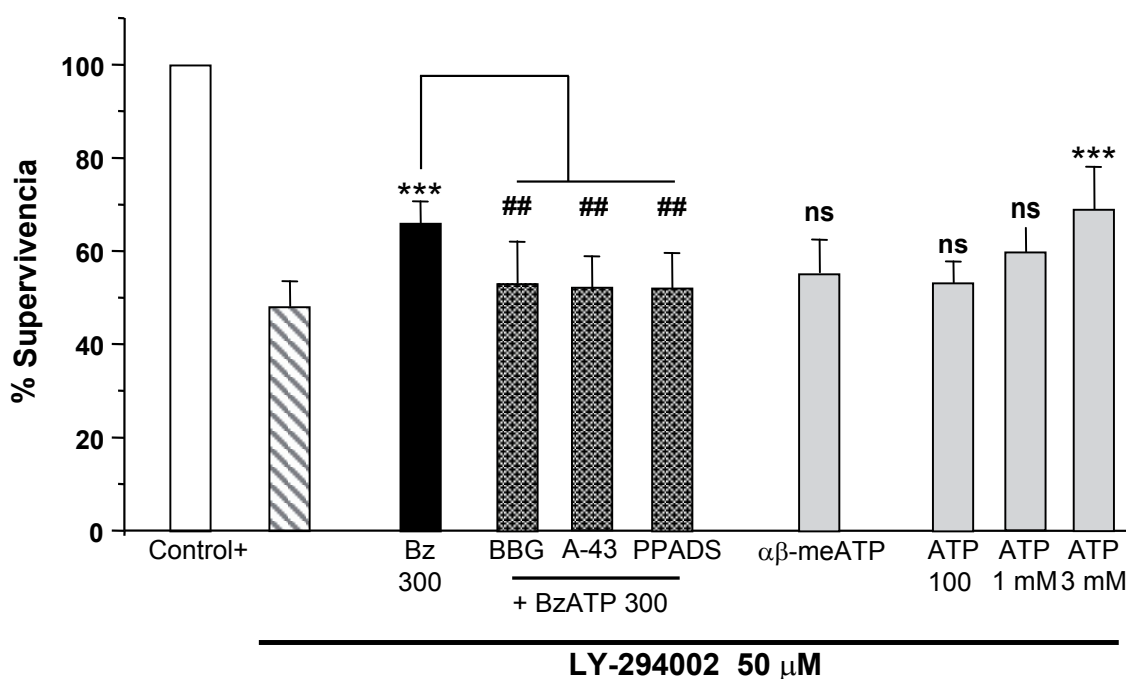


Figura 15. Efecto de diferentes tratamientos en la neuroprotección ejercida por el BzATP ante la inhibición de la PI3K con LY-294002. A) Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron estimuladas con BzATP 300 μ M (en presencia y ausencia de BBG 10 μ M, A-438079 1 μ M y PPADS 30 μ M durante 5 min de preincubación), $\alpha\beta$ -meATP 100 μ M y ATP 100 μ M, 300 μ M y 1mM antes de que se añadiera al medio LY-294002 50 μ M. La viabilidad celular se evaluó 24 horas después por medio del ensayo del MTT como se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.8.2). Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes al tratamiento con LY-294002, y con # cuando cada tratamiento con los antagonistas fue comparado con el de BzATP.

El efecto neuroprotector ejercido por el BzATP se perdió cuando las células fueron pretratadas con BBG, PPADS y A-438079, antagonistas del receptor P2X7, demostrando la implicación de dicho receptor en el efecto protector del BzATP (figuras 14 y 15). Es importante subrayar el hecho de que los antagonistas empleados no causaron por sí mismos efectos tóxicos sobre las neuronas granulares ni tampoco potenciaron la muerte inducida por el LY-294002, luego todo su efecto se debió exclusivamente al bloqueo ejercido sobre el receptor nucleotídico P2X7. Igualmente importante es el hecho de que ningún otro agonista nucleotídico fuera capaz de reproducir los efectos neuroprotectores del BzATP. Tanto el ATP como el α,β -meATP, que como indicamos anteriormente inducían incrementos significativos en los niveles de fosforilación de la GSK3, no lograron en cambio, rescatar de la muerte celular ocasionada por el inhibidor de la PI3K. Sin embargo, el ATP a concentraciones elevadas de 3mM sí reprodujo los efectos del BzATP, lo que en conjunto confirma que los efectos protectores del BzATP se producen a través de la activación de un receptor tipo P2X7 (figura 15).

El efecto protector del BzATP se perdía cuando el cultivo de las neuronas granulares se mantenía durante períodos de tiempo más prolongados, hasta 13 o 14 DIV (datos no mostrados). Estos datos coincidían con una disminución de la expresión del receptor P2X7 en estas etapas más maduras de cultivo. En cambio, el patrón de expresión de otras subunidades P2X, como P2X1, P2X3 y P2X4, no variaba de manera significativa durante el tiempo de cultivo (figura 16). Estos datos confirman una vez más que el receptor P2X7 es el responsable de la neuroprotección mediada por el BzATP

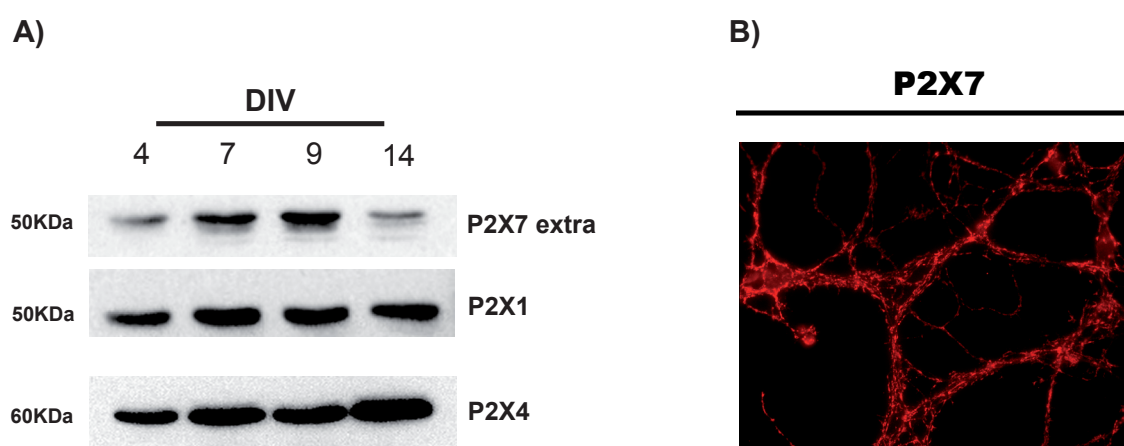


Figura 16. Expresión del receptor P2X7 en neuronas granulares de cerebelo. **A)** Experimentos de expresión de los principales receptores P2X por medio de Western Blot. Los extractos celulares fueron recogidos a 4, 7, 9 y 14 DIV y se realizaron experimentos de inmunotransferencia para los receptores P2X7 extracelular (1:200), P2X1 (1:200) y P2X4 (1:200) según lo descrito en Material y Métodos (apartado 2.4). Las bandas obtenidas muestran un tamaño 50 KDa para el P2X7 extra y P2X1 y de alrededor de 60 KDa para el P2X4, respectivamente, lo que encaja con lo descrito para estos receptores. **B)** Expresión del receptor P2X7 por inmunocitoquímica. Las neuronas granulares sobre cubreobjetos de vidrio tratadas con poli-L-lisina, se fijaron con solución de paraformaldehído al 4%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo específico para el P2X7 (1:200), y se revelaron con anticuerpos secundarios marcados con Cy3.

Resultados

1.2.5.- Vías de señalización implicadas en el efecto protector del BzATP. Papel de la GSK3.

En los siguientes experimentos se analizó la vía de señalización implicada en el efecto neuroprotector del BzATP, estudiando el efecto de distintas proteínas de transducción de señales. Como observamos en la figura 17, y en línea con lo observado con respecto a la fosforilación de la GSK3, el efecto sobre la supervivencia mediado por el BzATP sólo se anuló completamente cuando las células fueron pretratadas con el inhibidor de las PKCs, GF-I. El resto de inhibidores de proteínas de señalización utilizados, el KN-62, el PP-2 y el U-0126, para la CaMKII, src-tyrosina quinasas y las proteínas ERK1/2, respectivamente, no afectaron a la acción neuroprotectora del BzATP, ni tuvieron ningún efecto sobre la supervivencia celular por sí mismos. Cuando se utilizó el inhibidor específico de la GSK3, el SB-216763, el rescate de la muerte neuronal fue casi completo, lo que indicaba que el efecto neuroprotector mediado por el BzATP frente a la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K en neuronas granulares, podría estar producido por su acción sobre la actividad de la GSK3.

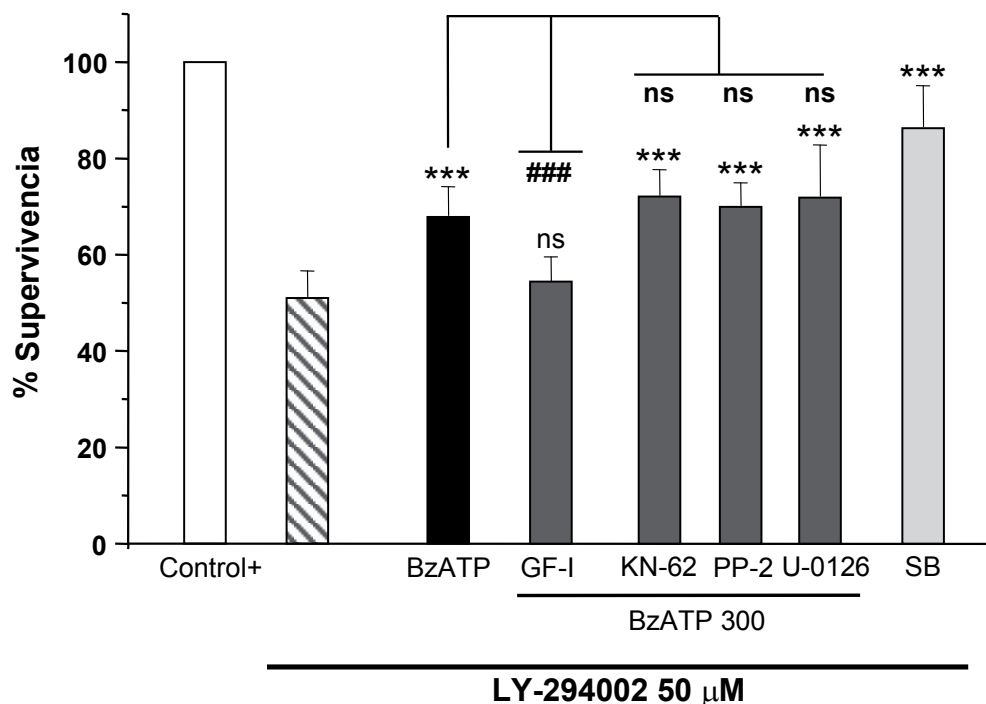


Figura 17. Efecto de diferentes tratamientos en la neuroprotección ejercida por el BzATP ante la inhibición de la PI3K con LY-294002. Las células en medio de cultivo completo se pretrataron durante 30 min con los siguientes inhibidores de transducción de señales: GF-I 1 μ M, U-0126 10 μ M, KN-62 11 μ M y PP-2 10 μ M. Posteriormente se estimuló con BzATP 300 μ M durante 10 min antes de añadir LY-294002 50 μ M. Cuando se empleó SB-216763 (inhibidor específico de la GSK3), el medio de cultivo fue sustituido por medio con una concentración de B-27 del 1% al que se añadió el inhibidor a una concentración de 3 μ M durante una hora antes de añadir el LY-294002. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes al tratamiento con LY-294002, y con # cuando cada tratamiento con los antagonistas fue comparado con el de BzATP.

Para confirmar el mecanismo de neuroprotección del BzATP se realizaron análisis sobre las principales proteínas implicadas en las vías de supervivencia para averiguar cuáles se veían activadas o inhibidas durante la inhibición de la PI3K. Como se muestra en la figura 18 A1 y B, el tratamiento con distintas concentraciones del inhibidor LY-294002 incrementó el niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2, indicativo de su activación. Estos niveles no sufrieron variaciones significativas cuando las células fueron estimuladas con BzATP, descartando la implicación de las ERK1/2 en la protección ejercida por el nucleótido. También fue descartada, como era esperado, la proteína Akt, ya que el LY-294002 indujo una dramática defosforilación, y por lo tanto inactivación de esta proteína, efecto que no se vio modificado tampoco en presencia del BzATP (figura 18 A1 y C).

Sí se produjeron variaciones, en cambio, con respecto al estado fosforilado de la proteína GSK3. De acuerdo con esto, el LY-294002 indujo una defosforilación significativa de la GSK3 que era parcialmente revertida por el tratamiento con el BzATP (figura 18 A1, D). Esta prevención fue menor cuando las células se trataron con concentraciones de 75 μ M del LY-294002, probablemente porque a estas concentraciones, el inhibidor estuviera actuando ya sobre otras quinasas. En medio de cultivo completo, que son las condiciones en las que se realizan estos experimentos, los niveles de fosforilación basal de la GSK3 son muy elevados (figura 18 A2). La asociación del efecto del BzATP a la prevención de la muerte apoptótica fue confirmada por medio de la evaluación de los niveles de uno de los principales efectores apoptóticos neuronales, el fragmento activo de la caspasa-3 (Linseman y cols., 2004). Estos niveles aumentaron drásticamente tras el tratamiento con el LY-294002, siendo mucho mayor su incremento, a medida que se incrementaba la concentración del inhibidor, y fueron prevenidos de manera significativa con el tratamiento con BzATP (figura 18 A1, E). Estos resultados en conjunto indicaban que la GSK3 podía ser la diana del BzATP en su efecto protector.

Como hemos mencionado anteriormente, el incremento de fosforilación en los residuos de serina 21/9 de la GSK3 es un efecto indicativo de la inhibición de su actividad catalítica, y la actividad de la GSK3 en neuronas ha de estar finamente regulada para mantener la supervivencia neuronal. De acuerdo con esto, la defosforilación de la GSK3 inducida por el LY-294002 estaría implicando una sobreactivación de la GSK3 que sería en parte responsable de la muerte celular. Y el BzATP al prevenir dicha fosforilación, estaría manteniendo un cierto grado de inhibición de la GSK3.

Resultados

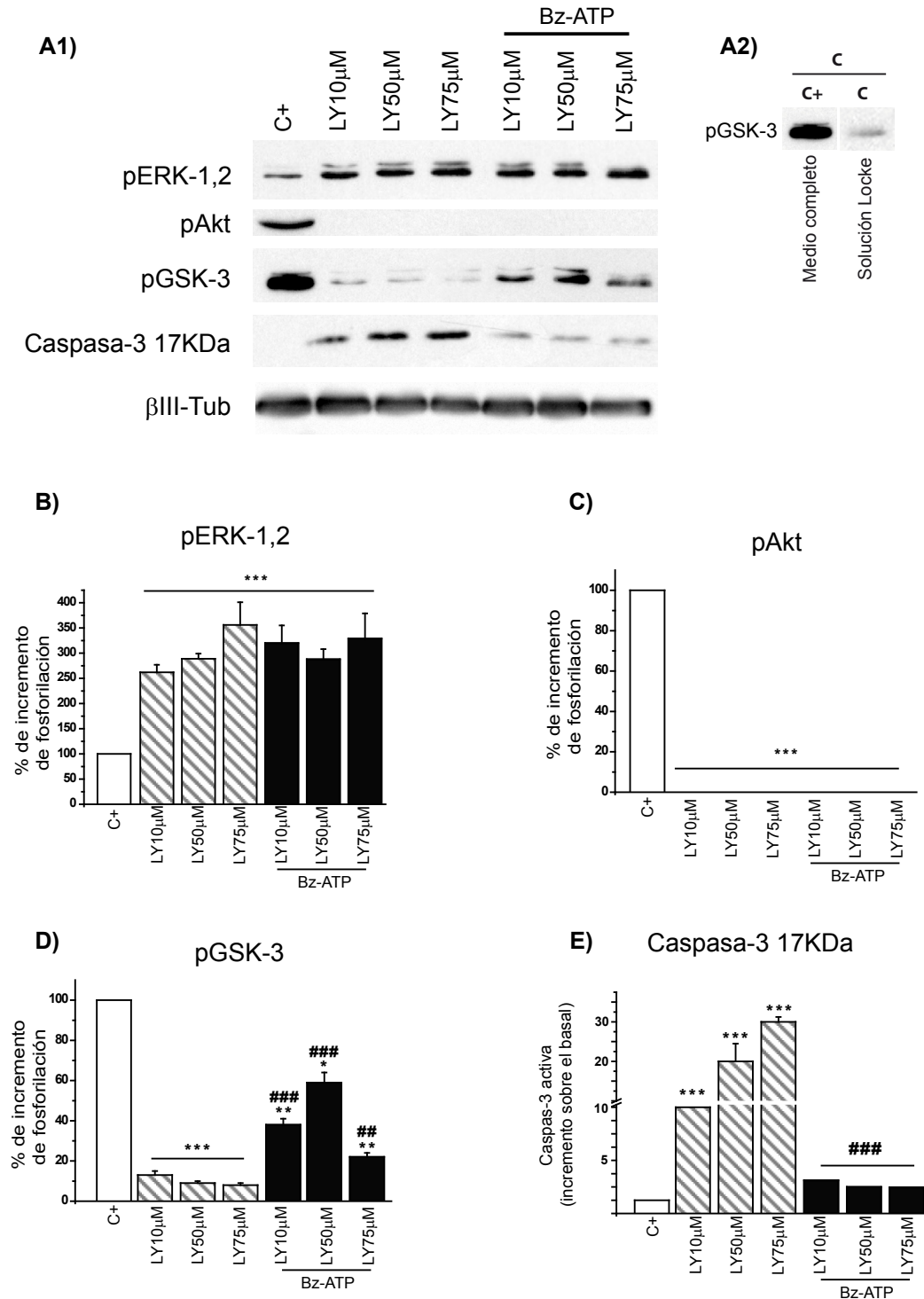


Figura 18. Efecto de la inhibición de la PI3K en los niveles de fosforilación de la ERK-1/2, Akt, GSK3 y en la activación de la caspasa-3. Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron estimuladas con BzATP 300 μM durante 10 min y seguidamente se añadió el LY-294002 50 μM. Los extractos celulares se recogieron 6 horas después de añadir el inhibidor y se analizó por inmunotransferencia, los niveles de la ERK-1/2 (B), Akt (C), GSK3 (D), además de la presencia de niveles detectables de el fragmento activo de 17 KDa de la Caspasa-3 (E). A2) Comparación de los niveles basales de fosforilación de la GSK3, cuando los experimentos se llevan a cabo en medio completo, tal y como se realizan los ensayos de viabilidad (C +), y cuando se realizan en solución Locke (C), que corresponden a los experimentos de señalización previos. Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas, y con # cuando cada concentración con LY-294002 fue comparado en presencia o ausencia de BzATP.

El nivel de activación de la proteína GSK3 se evaluó midiendo el estado de fosforilación de esta proteína y de uno de sus sustratos mejor conocidos en neuronas, la proteína Tau, cuyo residuo de Ser393 es fosforilado específicamente por la GSK3 (Bennecib y cols., 2000). Estos experimentos se llevaron a cabo a distintos tiempos de tratamiento con 50 μ M del inhibidor LY-294002 (figura 19 A,B).

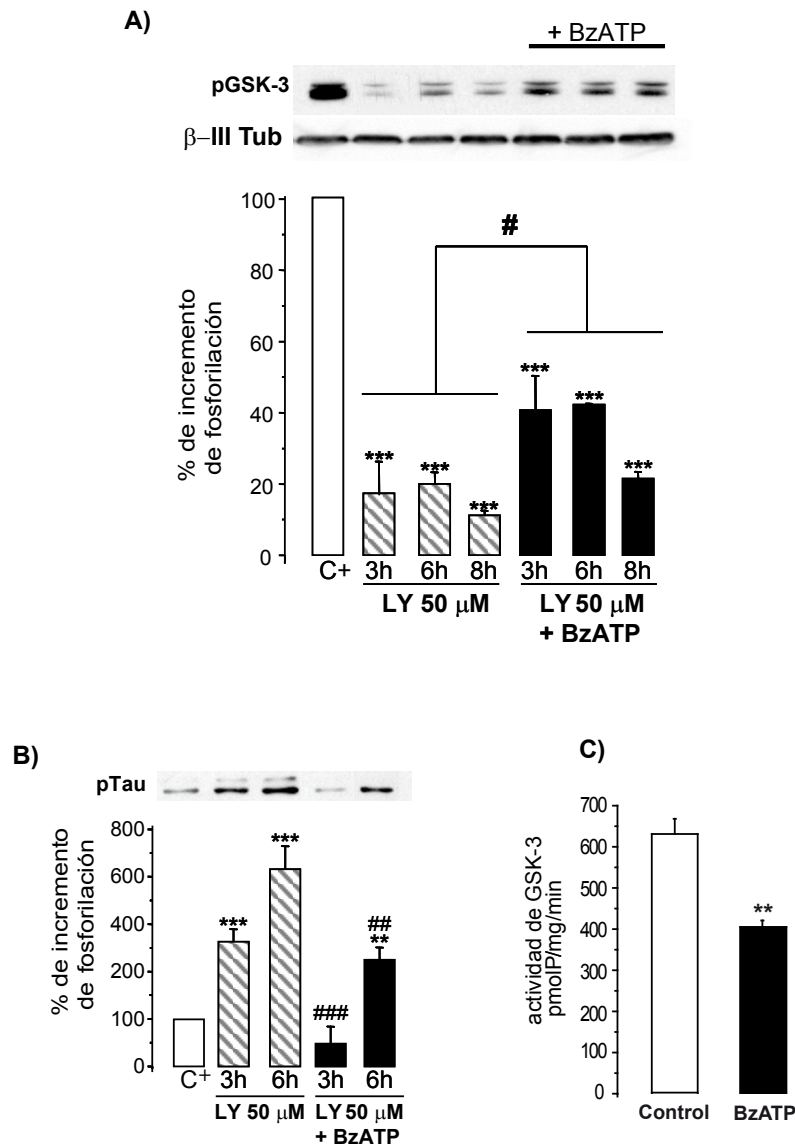


Figura 19. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre los niveles de fosforilación de GSK3 y Tau en función del tiempo, y sobre la actividad catalítica de la GSK3. A) Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se estimularon, en presencia y ausencia de BzATP 300 μ M durante 10 min antes de añadir el LY-294002 a una concentración de 50 μ M. Los extractos celulares fueron recogidos a diferentes tiempos de tratamiento con el LY-294002 y se analizaron, los niveles de fosforilación de la proteína GSK3 (A) y de fosforilación de Tau, en su residuo de Ser396 (B). Los histogramas muestran los porcentajes de variación con respecto a las células no estimuladas (100% valor control), y fueron obtenidas por medio de la normalización de los valores densitométricos de las fosfoproteínas GSK3, y Tau con respecto a los obtenidos de la β -tubulina, empleada como control de carga. (C) Las neuronas granulares en cultivo fueron estimuladas con BzATP 100 μ M durante 10 minutos. Los extractos celulares obtenidos se sometieron a una reacción de fosforilación con el péptido GS-1, como se describe en Material y Métodos (apartado 2.7). Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas, y con # cuando cada tiempo de incubación con LY-294002 fue comparado en presencia o ausencia de BzATP.

Paralelamente a la defosforilación de la GSK3 que se observaba tras el tratamiento con el inhibidor LY-294002, ya detectable a partir de las 3 primeras horas de incubación, se observó un aumento de la fosforilación de la proteína Tau, lo que indicaba un aumento de la actividad de la GSK3 sobre ella. Mientras que en presencia del BzATP se observaba una recuperación parcial de los niveles de fosforilación de la GSK3 y una disminución de la fosforilación sobre Tau a cualquiera de los tiempos ensayados.

Además de mediante ensayos indirectos, se midió la actividad quinasa de la GSK3 sobre el péptido sintético GS-1, de igual manera que se había realizado para el agonista metabotrópico 2MeSADP (apartado 1.1.4.1). Como muestra la figura 19 C la actividad de la proteína GSK3 se redujo significativamente cuando las células fueron estimuladas con BzATP, pasando de $631,4 \pm 37,3$ pmolP/mg/min en el caso de las células control a $405,6 \pm 16$ pmolP/mg/min en presencia del agonista nucleotídico.

Todos estos datos en conjunto confirman que los efectos antiapoptóticos del BzATP están relacionados con su capacidad para mantener inhibida la actividad catalítica de la GSK3. (Figuras 18 y 19).

Finalmente, también se evaluaron las variaciones de los niveles del fragmento activo de la caspasa-3 a lo largo del tiempo en presencia y ausencia del BzATP para confirmar su asociación a la prevención de la apoptosis. Como podemos ver en la figura 20 los niveles del fragmento de 17 KDa de la caspasa-3 fueron detectables tras 3 horas de tratamiento con el LY-294002, incrementándose dramáticamente tras 6 y 8 horas. Según se esperaba, estos incrementos fueron significativamente prevenidos cuando las células se estimularon con el agonista nucleotídico del receptor P2X₇, el BzATP.

Los resultados obtenidos con el BzATP en las neuronas granulares de cerebelo indican que este agonista nucleotídico está activando un receptor tipo P2X₇, que está acoplado a la fosforilación e inhibición de la proteína GSK3 a través de una ruta dependiente de PKC. Este mecanismo de señalización parece constituir una vía de supervivencia alternativa cuando la vía de la PI3K/Akt se encuentra comprometida, demostrando que los nucleótidos también pueden ser señales relevantes en el mantenimiento y supervivencia neuronal.

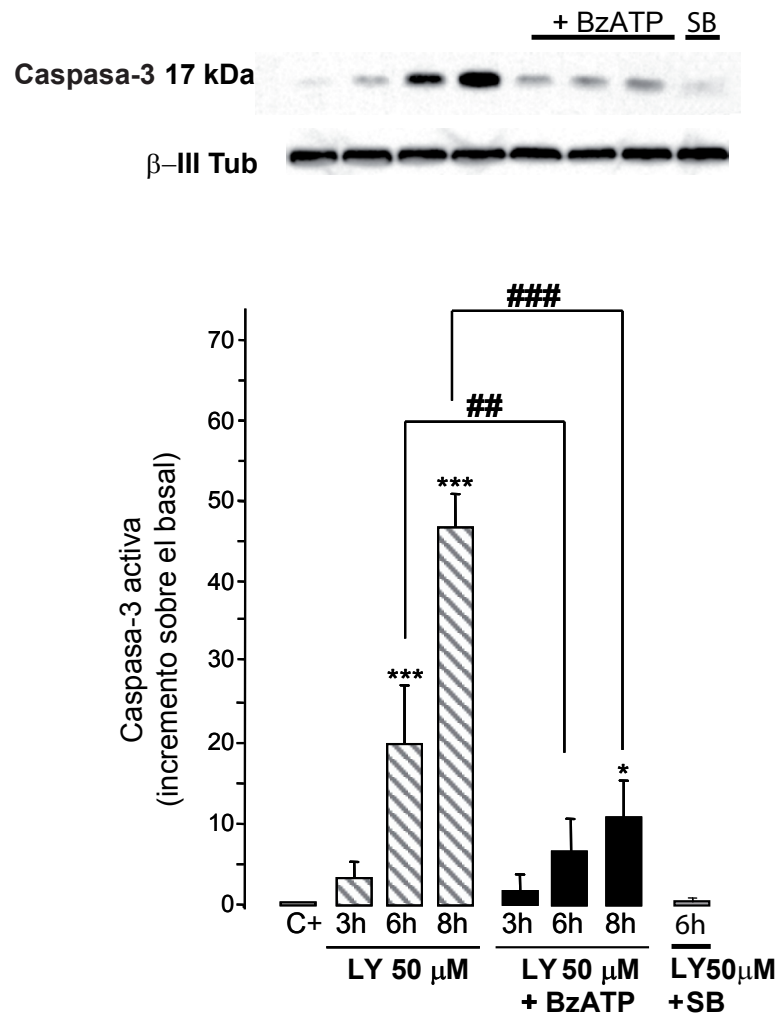


Figura 20. Efecto de la inhibición de la PI3K sobre los niveles de caspasa-3 activa. Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se estimularon, en presencia y ausencia de BzATP 300 μ M durante 10 min antes de añadir el LY-294002 a una concentración de 50 μ M. Los extractos celulares fueron recogidos a diferentes tiempos de tratamiento con el LY-294002 y se analizó por medio de inmunotransferencia, la presencia o ausencia del fragmento activo de 17 KDa de la caspasa-3. Los histogramas muestran los porcentajes de variación con respecto a las células no estimuladas (100% valor control), y fueron obtenidas por medio de la normalización de los valores densitométricos de la caspasa-3 con respecto a los obtenidos de la β -tubulina, empleada como control de carga. Los valores mostrados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes de cultivos diferentes. Los datos se analizaron por medio de los test de Dunnett y Tukey considerándose estadísticamente significativos a *** p <0.001 y * p <0.05 cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas, y a #### p <0.001, ## p <0.01 y cuando se compararon entre sí cada tiempo de incubación de LY-294002 en ausencia y presencia de BzATP.

2.- ESTUDIOS DE SINERGISMO ENTRE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR EL BzATP Y LA MEDIADA POR EL NMDA Y BDNF EN NEURONAS GRANULARES.

Como hemos observado en el apartado anterior de resultados, el efecto de protección del BzATP en las neuronas granulares, se debe a su capacidad de mantener inhibida la GSK3 cuando se anula la vía principal de supervivencia mediada por la PI3K/Akt. Además del BzATP, nos preguntamos si otros factores con conocidas acciones neuroprotectores en las neuronas granulares, como el NMDA, IGF-I o el BDNF, podrían mediar acciones similares a las descritas para el BzATP relacionadas con la señalización mediada por la GSK3 (Lafon-Cazal y cols., 2002) (Yamagishi y cols., 2003) (Zhang y cols., 1998) (Hetman y cols., 1999). Además, teniendo en cuenta que el incremento de supervivencia obtenido con el BzATP era parcial, nos llevó a pensar en la posibilidad de que el BzATP pudiera actuar de forma sinérgica con estos y potenciar los efectos protectores.

Ya habíamos comprobado en el apartado 1.2.4. que el IGF-I no era capaz de rescatar de la muerte inducida por el inhibidor de la PI3K, LY-294002, ya que su señalización está principalmente mediada por la vía PI3K-Akt (Subramaniam y cols., 2003), y por tanto nos servía de control negativo. Por ello, a continuación, nos centramos en el estudio del posible efecto protector del NMDA y del BDNF.

2.1.- Efecto sinérgico del BzATP con el NMDA y BDNF en la protección frente a la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K en neuronas granulares.

Las neuronas granulares en cultivo, fueron estimuladas en presencia de BzATP y NMDA a distintas concentraciones. Tras la realización de estas estimulaciones se añadió el inhibidor de la PI3K, LY294002 y tras 24 horas de incubación se llevó a cabo la medida de la supervivencia neuronal por medio del ensayo del MTT. Como se muestra en la figura 21, el NMDA fue capaz de proteger frente a la muerte por la inhibición de la PI3K a concentraciones por encima de 50 μ M. El BzATP potenció el efecto protector del NMDA a todas las concentraciones de NMDA ensayadas, siendo menos evidente su efecto a la concentración mayor de 100 μ M. Para comprobar la especificidad del efecto del NMDA, se utilizó el antagonista de receptores de glutamato de tipo NMDA, el MK-801. (figura 21).

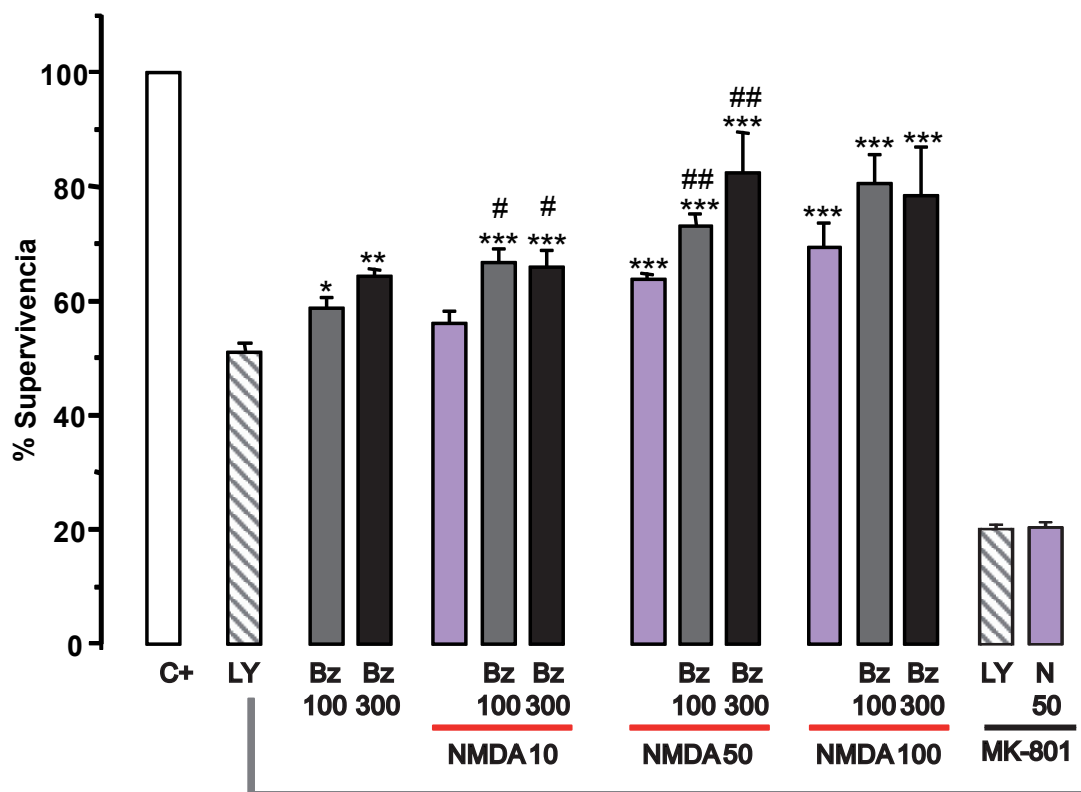


Figura 21.- Sinergismo ejercido entre el BzATP y el NMDA en la neuroprotección frente a la inhibición farmacológica de la PI3K. Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio completo fueron estimuladas con BzATP a concentraciones de 100 y 300 μ M en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de NMDA de 10, 50 y 100 μ M, durante 10 min. También se realizaron estimulaciones con BzATP 300 μ M y NMDA 50 μ M tras la incubación de las células durante 10 min con el antagonista MK-801 1 μ M. Tras estas estimulaciones se añadió el inhibidor LY-294002 a una concentración de 50 μ M. Estos experimentos se realizaron rutinariamente en presencia de adenosina deaminasa (1U/mL). La viabilidad celular se evaluó 24 horas después por medio del ensayo de MTT. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles de supervivencia tras el tratamiento con LY-294002, y con # cuando se comparó cada tratamiento con las distintas concentraciones de NMDA en presencia o ausencia de BzATP.

Estudios semejantes se llevaron a cabo estimulando las neuronas granulares con BDNF a distintas concentraciones, en presencia y ausencia de BzATP. El BDNF también tenía un efecto protector frente a la muerte por la inhibición de la PI3K, que era patente por encima de una concentración de 5ng/ml. Además, el incremento en los niveles de supervivencia se potenció cuando la estimulación se realizó en combinación con el BzATP (figura 22). Asimismo, se realizaron experimentos en presencia del inhibidor del receptor TrkB de BDNF, el K-252a. Este compuesto bloqueó completamente el efecto protector del BDNF, pero no el del BzATP, que siguió manteniendo su efecto neto, indicando que la protección ejercida por el BzATP no se produce a través de la transactivación del receptor TrKB.

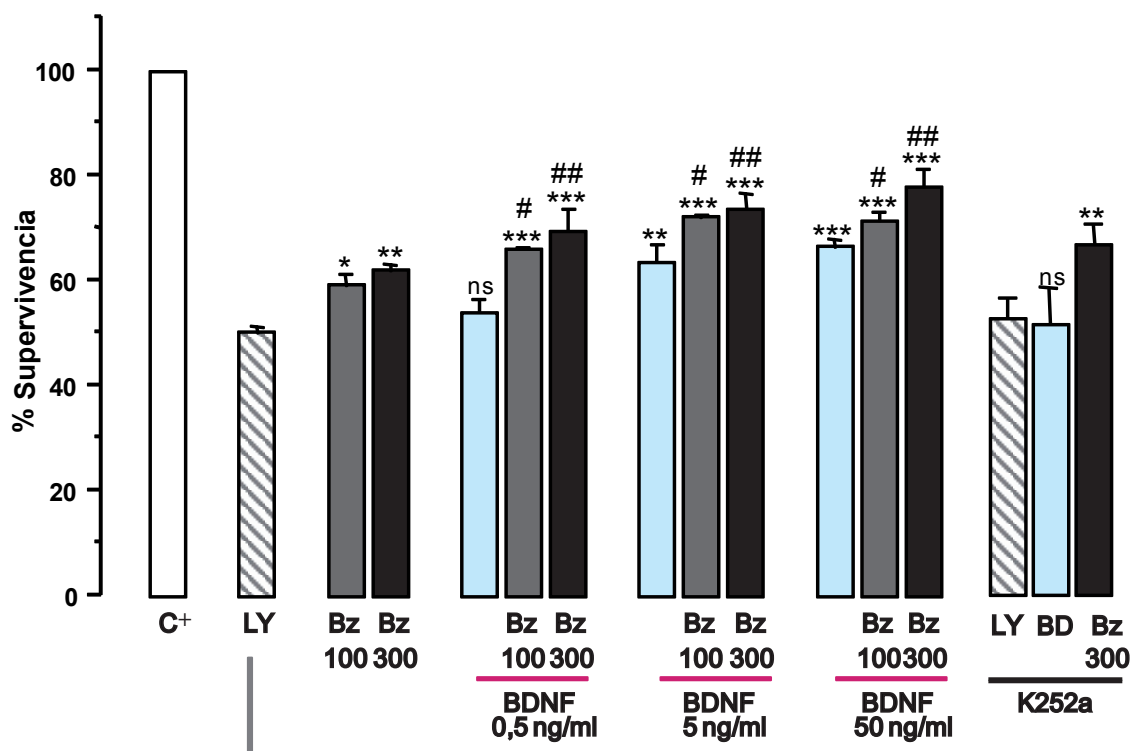


Figura 22.- Sinergismo entre el BzATP y el BDNF en la neuroprotección frente a la inhibición farmacológica de la PI3K. Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo fueron estimuladas con BzATP a concentraciones de 100 y 300 μ M en presencia o ausencia de concentraciones de BDNF de 0.5, 5 y 50 ng/mL, durante 10 min. También se realizaron estimaciones con BzATP 300 μ M y BDNF 5 ng/mL tras la incubación de las células durante 20 min con el inhibidor K252a 200 nM. Tras estas estimaciones se añadió el inhibidor LY-294002 a una concentración de 50 μ M y la viabilidad celular se evaluó 24 horas después por medio del ensayo de MTT. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles de supervivencia tras el tratamiento con LY-294002, y con # cuando se comparó cada tratamiento con las distintas concentraciones de BDNF en presencia o ausencia de BzATP.

2.2.- Vías de señalización implicadas en la neuroprotección mediada por el NMDA y el BDNF.

Con el fin de elucidar las vías responsables en la protección del NMDA y BDNF, se llevaron a cabo experimentos de viabilidad en presencia de los inhibidores de las proteínas de las principales vías de señalización potencialmente implicadas, como la vía de la PKC/GSK3, que era la activada por el BzATP, o la vía de las MAPK.

De la misma manera que se había observado para el BzATP, el efecto neuroprotector del NMDA sólo se anuló completamente en presencia de los inhibidores de las PKCs, GF-I y Gö6976, inhibidores de las PKCs o de únicamente las PKCs dependientes de calcio, respectivamente, mientras que no se vio afectado por el inhibidor de las MAPK, el U-0126 (figura 23). El BDNF, en cambio, veía bloqueados sus efectos neuroprotectores en presencia tanto de los inhibidores de las PKCs como del inhibidor de las MAPK (figura 23). Esto pone de manifiesto una vez más,

que el NMDA y el BzATP protegen a las neuronas granulares por una misma vía de señalización dependiente de PKC, mientras que en el caso de la protección mediada por el BDNF, estarían implicadas, además de las PKCs, otras vías de señalización alternativas, como las ERK.

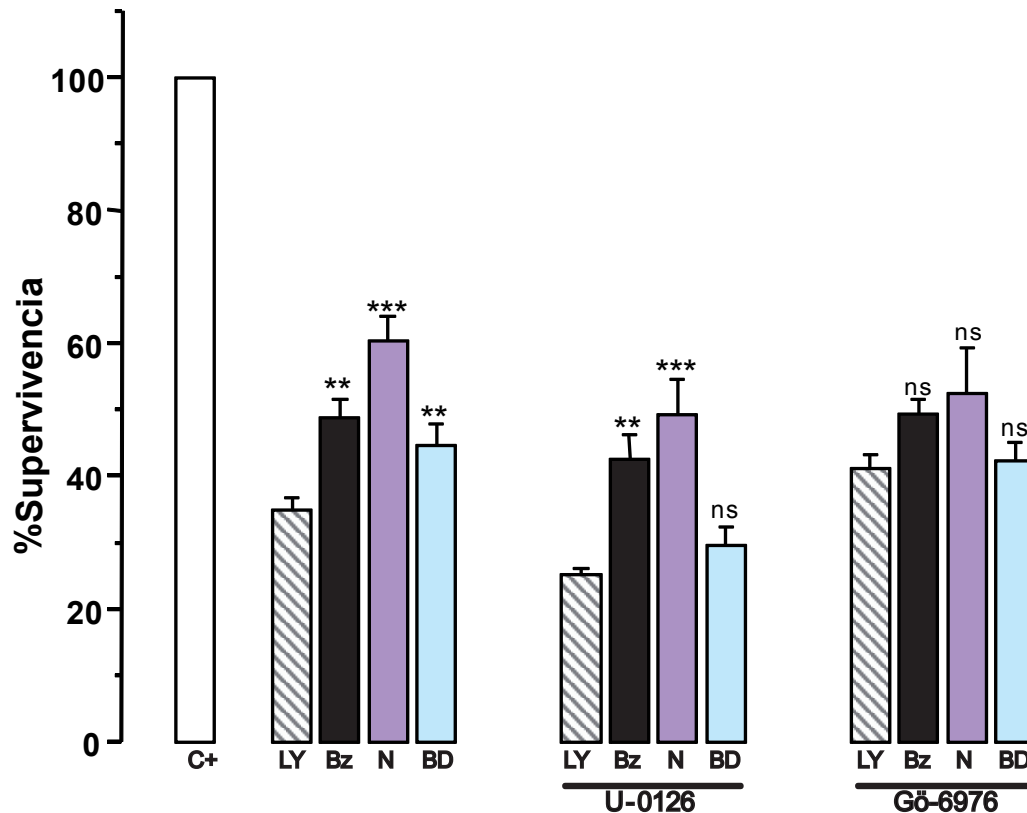


Figura 23. Efecto de diferentes tratamientos en la neuroprotección ejercida por el BzATP, NMDA y BDNF frente la inhibición de la PI3K. Las neuronas granulares, en presencia y ausencia de los inhibidores Gö6976 200nM y U-0126 10μM, tras este pretratamiento se estimularon durante 10 min con BzATP 300μM, NMDA 50μM y 50ng/mL de BDNF antes de añadir el inhibidor de la PI3K, el LY-294002 50μM. La viabilidad celular se evaluó 24 horas después por medio del ensayo de MTT. Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de tres experimentos independientes de distintos cultivos. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles de supervivencia tras el tratamiento con LY-294002.

Teniendo en cuenta que la inhibición de la proteína GSK3 estaba implicada en el efecto protector mediado por el BzATP (apartado 1.2.5.), se llevaron a cabo experimentos para determinar si ocurría lo mismo con el NMDA y BDNF. Como era de esperar, los dos factores fueron capaces de revertir la defosforilación de la GSK3 producida por el tratamiento prolongado con el inhibidor de la PI3K, LY-294002, observándose un ligero aumento en el grado de fosforilación de esta proteína cuando se había coestimulado con BzATP+NMDA, pero no con BzATP+BDNF (figura 24B). Cuando se analizó el efecto de estos agonistas sobre las proteínas ERK1/2, se observó que el BDNF era el único que incrementaba significativamente los niveles de fosforilación de estas proteínas, indicando que las ERK1/2 podrían estar jugando un papel muy importante en la señalización y protección mediada por el BDNF (figura 24C).

Resultados

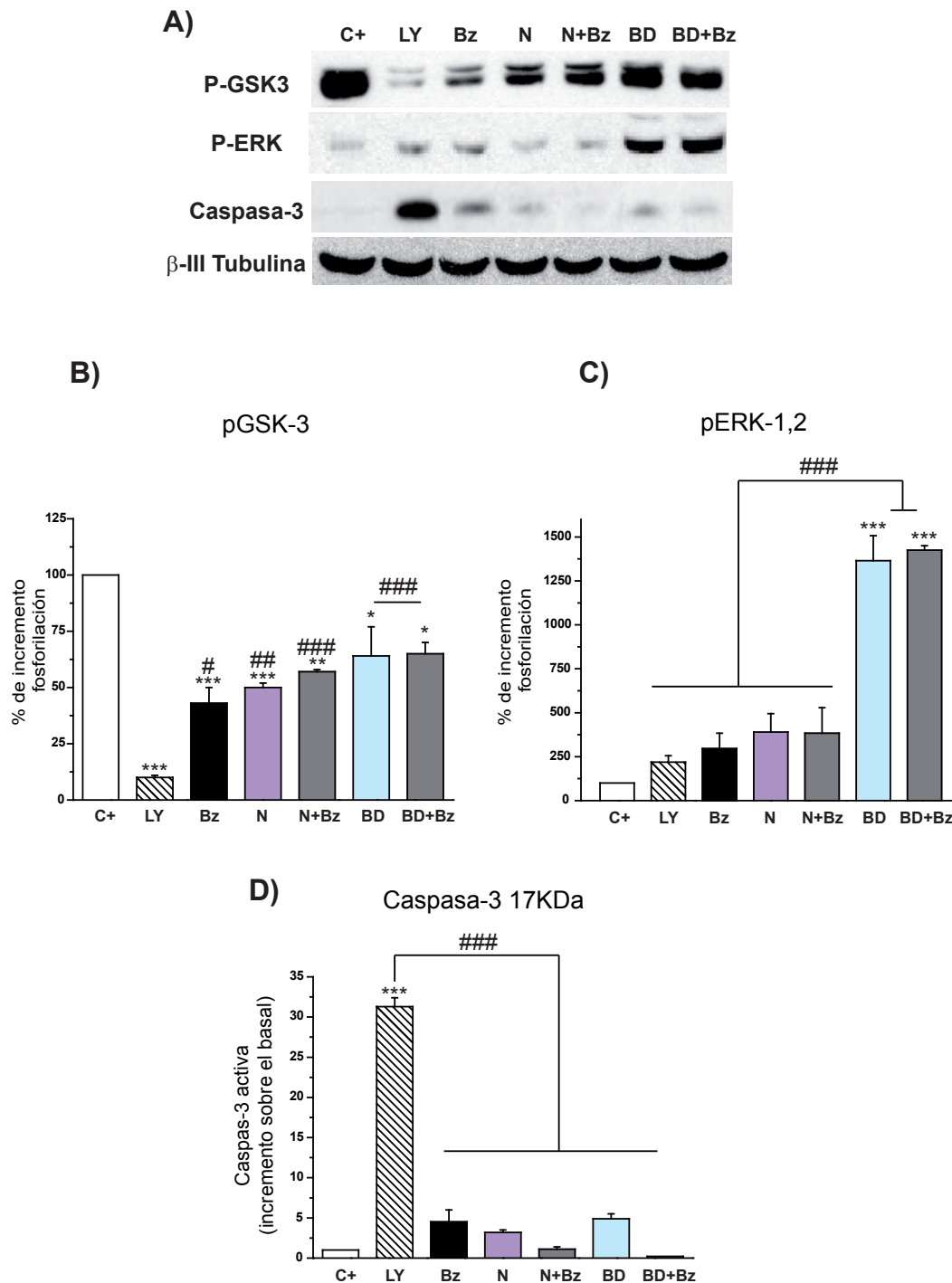


Figura 24. Análisis del efecto de la inhibición de la PI3K en los niveles de fosforilación de la GSK3, ERK-1/2, y en la activación de la caspasa-3 en presencia de BzATP, NMDA y BDNF. Las células granulares de cerebelo en medio de cultivo completo se estimularon durante 10 min con BzATP 300 μ M NMDA 50 μ M y BDNF 50ng/mL, tras los cuales se trataron con LY-294002 50 μ M. Los extractos celulares se recogieron 6 horas después y se analizaron por inmunotransferencia, los niveles de fosforilación de la GSK3 (**B**) y de las ERK-1/2 (**C**), además de la presencia de niveles detectables del fragmento activo de 17 KDa de la Caspasa-3 (**D**) como se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.4). Los histogramas muestran los porcentajes de variación con respecto a las células no estimuladas (100% valor control), y fueron obtenidas por medio de la normalización de los valores densitométricos de las fosfoproteínas GSK-3, Akt y ERK-1,2 y de la caspasa-3, con respecto a los obtenidos de la β -tubulina, empleada como control de carga. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas, y con # cuando se comparó entre sí cada tratamiento con LY-294002 en ausencia y presencia de los agonistas.

Estos datos, en conjunto, indicarían que tanto el BzATP como el NMDA protegen de la inhibición farmacológica de la PI3K, previniendo la defosforilación y consiguiente activación de la GSK3 por una vía dependiente de PKC. En el efecto protector del BDNF, además de la GSK3, intervendrían de manera muy activa las proteínas ERK1/2.

Por último, se realizaron medidas de los niveles de caspasa-3 activa, para evaluar la activación de la apoptosis. En este caso y de igual manera a lo observado para el BzATP, el NMDA y el BDNF redujeron significativamente los niveles del fragmento activo de la caspasa-3, inducidos por el tratamiento con LY29400. Además, y en consecuencia con lo que se había observado en los experimentos de viabilidad, esta reducción se vio potenciada cuando el BzATP se combinaba tanto con el NMDA como con el BDNF (figura 24D).

2.3 Sinergismo del BzATP y el NMDA en la fosforilación de la GSK3.

Según lo indicado hasta ahora el BzATP y NMDA cooperan en el efecto protector y esto está de acuerdo con que el BzATP y el NMDA estuvieran colaborando en la misma vía de señalización, dependiente de PKC-GSK3. Por ello, era esperable que la cooperación se debía reproducir a nivel de la fosforilación de la GSK3. Como se muestra en la figura 25, el BzATP fue capaz de potenciar la fosforilación de la GSK3 inducida por NMDA, a concentraciones submáximas de ambos agonistas.

En cambio, esta concurrencia a nivel de la señalización de la GSK3 no se reprodujo al llevar a cabo estos experimentos con el BDNF. En efecto, la fosforilación de la GSK3 no se vio potenciada por la presencia del BzATP, a ninguna de las concentraciones que fueron analizadas (datos no mostrados). Estos datos apuntan a que la colaboración entre BDNF y BzATP se debe a que utilizan distintas vías de supervivencia. En el caso del BDNF, están implicadas tanto la GSK3 como las ERK1/2.

Con objeto de corroborar estos datos, se analizó el mecanismo de señalización del NMDA y el BDNF hacia la GSK3 en las neuronas granulares. Como se puede ver en la figura 26, la fosforilación en serina de la GSK3 inducida tanto el NMDA como el BDNF no parecía depender de las ERK1/2, ya que no se modificaba con el inhibidor de la MEK-1 (U-0126), pero sí se bloqueaba al inhibir las PKCs, con los inhibidores GF-I y Gö-6976. Las diferencias entre ambos se encontraron cuando se empleó wortmanina como inhibidor de la PI3K, ya que este tratamiento bloqueó totalmente la fosforilación de la GSK3 inducida por BDNF, pero sólo redujo parcialmente la inducida por NMDA. El efecto del NMDA sólo se bloqueó totalmente cuando se combinó la wortmanina con los inhibidores de la PKC (Figura 26).

Resultados

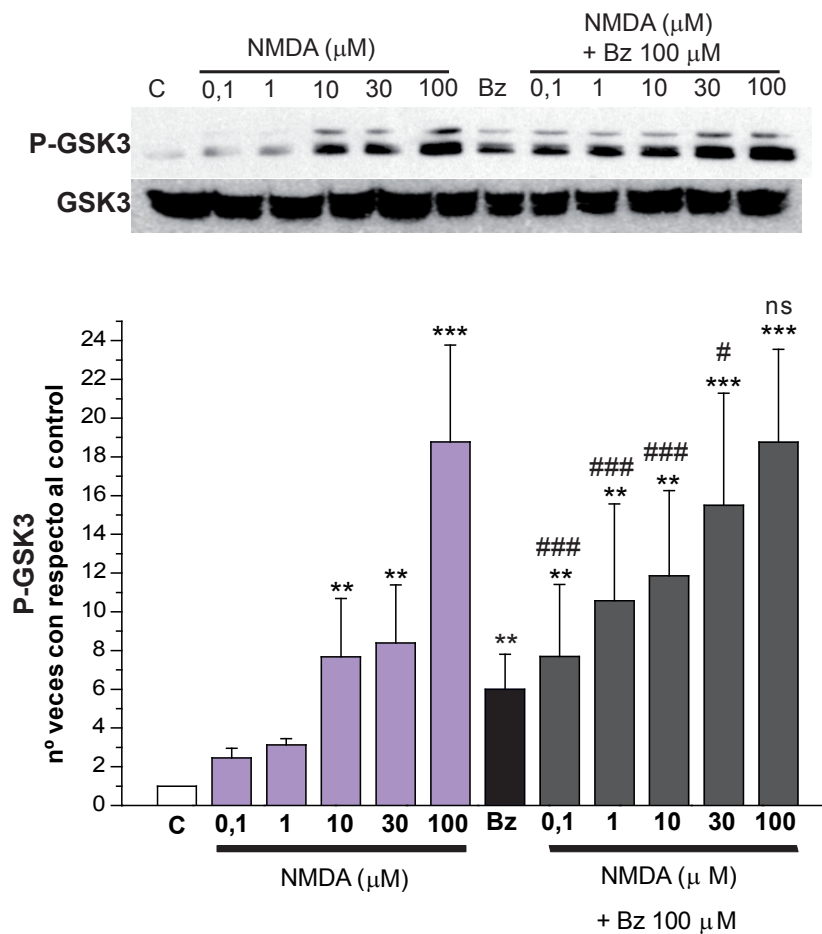


Figura 25. Análisis de la cooperación ejercida entre el BzATP y el NMDA en la fosforilación de la GSK3. Las neuronas granulares en cultivo fueron estimuladas con concentraciones de NMDA 0,1, 1, 10, 30 y 100μM en presencia y ausencia de BzATP 100μM durante 10 min. Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas, y con # cuando se compararon los incrementos de fosforilación ejercidos por el NMDA con los ejercidos por estas mismas concentraciones en presencia de BzATP.

Estos resultados confirman que existe un paralelismo entre la señalización del NMDA hacia la GSK3 y la que media sus efectos neuroprotectores, de igual manera que se había observado para el BzATP. En este sentido, aunque el receptor NMDA de glutamato requiere la actividad tanto de la PI3K como de la PKC para lograr su máximo efecto sobre la fosforilación de la GSK3, estas vías son independientes y pueden por lo tanto suplirse una a la otra, lo que estaría en consonancia con la neuroprotección observada en los experimentos de viabilidad al inhibirse farmacológicamente la PI3K.

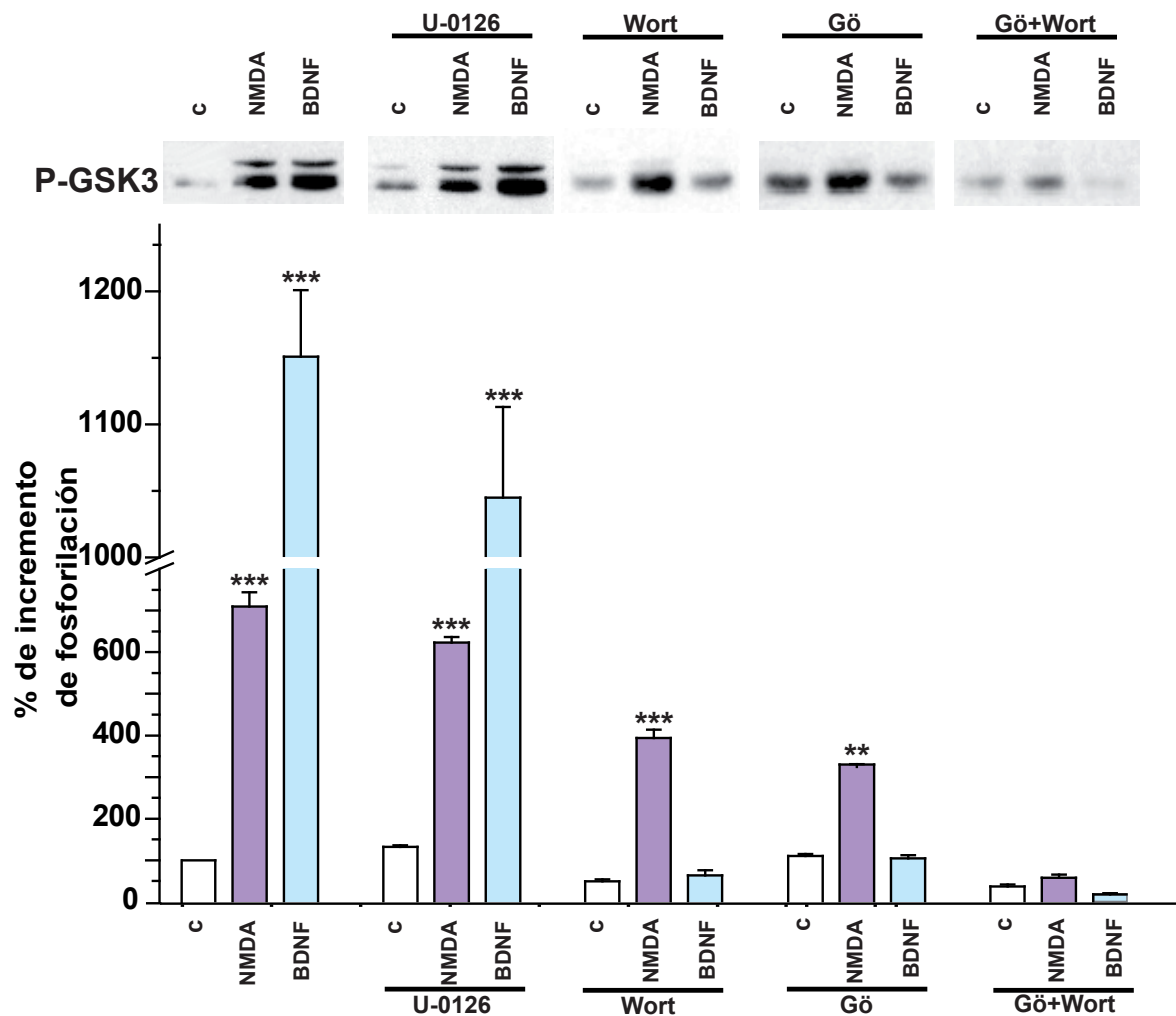


Figura 26. Análisis de la señalización implicada en la fosforilación de la GSK3 inducida por el NMDA y el BDNF. Las neuronas granulares fueron tratadas durante 30 min con los inhibidores: U-0126 10 μ M, wortmanina 1 μ M y Gö6976 200nM y posteriormente fueron estimuladas con NMDA 50 μ M y BDNF 50ng/mL durante 10 min, manteniendo los inhibidores durante la estimulación. Posteriormente se analizaron los niveles de fosforilación de la GSK3. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas.

El BDNF en cambio parece requerir de una activación secuencial tanto de la PKC como de la PI3K para llegar a la GSK3, lo que también iría en la línea de lo observado en los experimentos anteriores, donde el BDNF no pudo rescatar de la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K cuando las PKCs están inhibidas. En el efecto protector del BDNF además estarían implicadas las proteínas ERK1/2, aunque no parecen ser importantes para la fosforilación de la GSK3, al menos cuando la PI3K está funcional. Por tanto, el BDNF puede utilizar dos vías para explicar su efecto neuroprotector frente a la inhibición de la PI3K, una vía dependiente de PKC-GSK3 y otra vía dependiente de PKC-ERK.

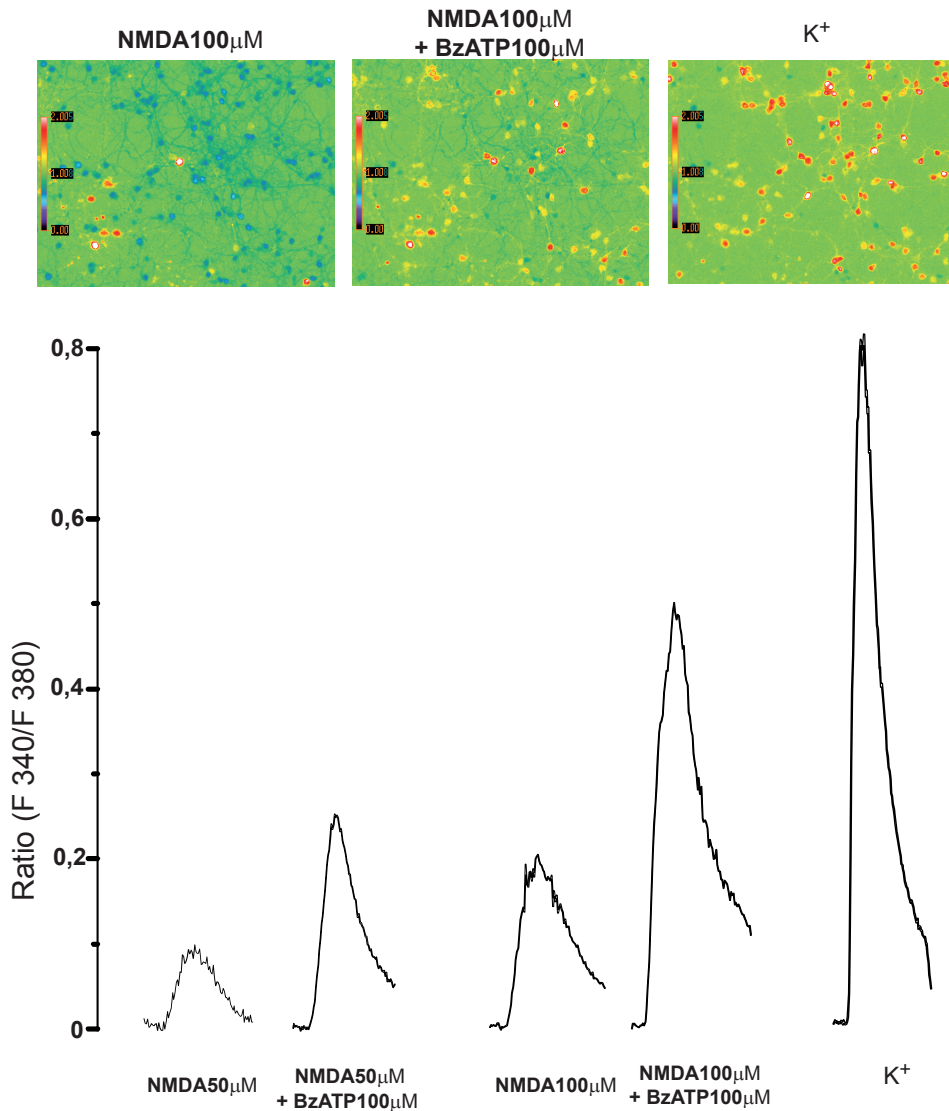


Figura 27. Efecto cooperativo del BzATP y del NMDA en la señal de calcio en las neuronas granulares de cerebelo. Las neuronas granulares cargadas con la sonda fura-2 fueron estimuladas durante 30 segundos con NMDA a concentraciones de 50μM y 100μM, en presencia y ausencia de BzATP a 100μM. Entre una aplicación y la siguiente transcurrieron 5 minutos de lavado con solución Locke. Finalmente las células fueron estimuladas con KCl 30mM para comprobar la funcionalidad de las neuronas. Las imágenes muestran los fotogramas de respuesta máxima de entrada de calcio en cada una de las estimulaciónes.

2.4.- Sinergismo entre el BzATP y el NMDA en la señal de calcio en las neuronas granulares de cerebelo.

La cooperación entre el BzATP y el NMDA en la fosforilación de la GSK3 requiere de una serie de etapas previas en la cascada de señalización. Era lógico preguntarse si dicha cooperación también se podría producir a otros niveles en la ruta de señalización que disparan estos dos agonistas, como por ejemplo a nivel de la entrada de calcio, ya que ambos agonistas activan receptores ionotrópicos. Para ello, se realizaron experimentos de imagen de calcio con la sonda fura-2 en células coestimuladas con concentraciones submáximas de BzATP de 100μM y con concentraciones crecientes de NMDA. Como se muestra en la figura 27, los primeros

datos arrojados por estos experimentos indican que el BzATP era capaz de potenciar la entrada de calcio inducida por el NMDA en las neuronas granulares de cerebelo. El efecto del BzATP por sí solo fue muy bajo (datos no mostrados), mientras que indujo una potenciación muy significativa, en torno a dos veces del incremento de los niveles de calcio intracelular cuando las células se estimularon desde 10 hasta 100 μ M de NMDA.

Para comprobar que la potenciación que observábamos se debía únicamente a la actividad del BzATP sobre el receptor P2X7 neuronal, se testaron diferentes antagonistas de los receptores purinérgicos. La potenciación ejercida por el BzATP se bloqueó en presencia de los antagonistas BBG y PPADS, que inhiben el receptor P2X7, mientras que el antagonista TNP-ATP más específico de los receptores P2X1 y P2X3 no mostró ningún efecto (figura 28). El hecho de que el PPADS bloqueara completamente el efecto del BzATP en la potenciación de la entrada de calcio mediada por el NMDA, nos permitió también excluir la posible implicación del receptor P2X4, ya que este receptor no muestra sensibilidad alguna por dicho antagonista.

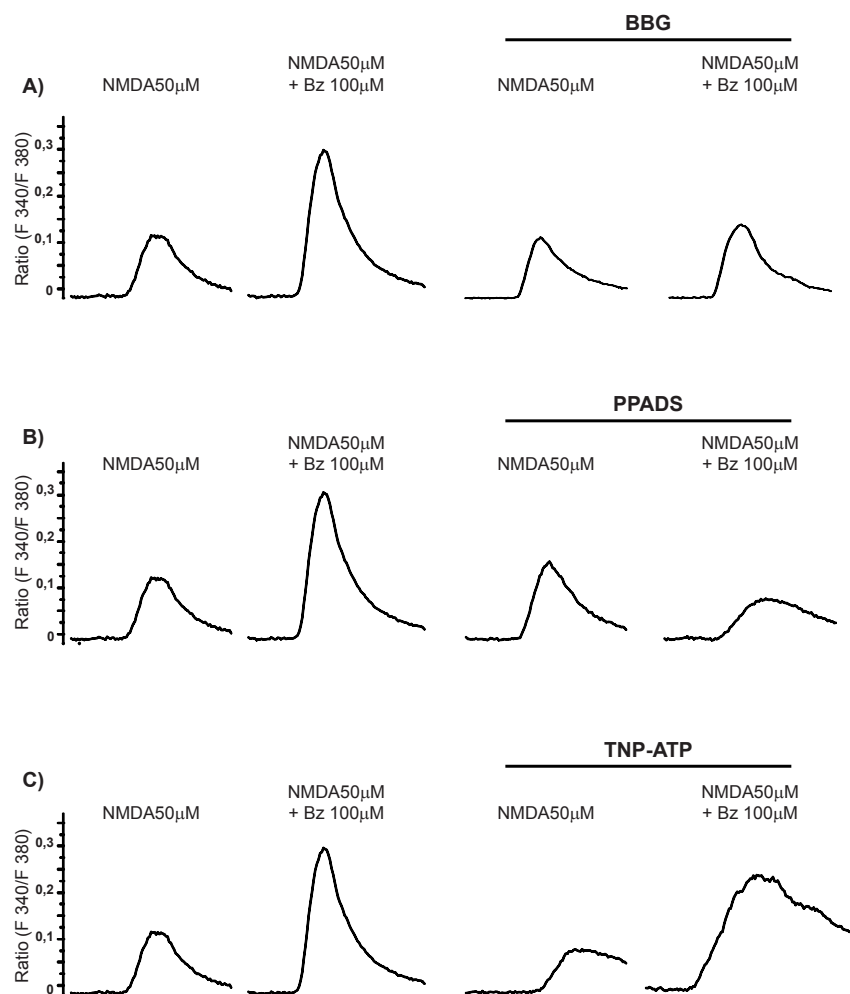


Figura 28. Efecto cooperativo del BzATP y del NMDA en la señal de calcio en las neuronas granulares de cerebelo. Las neuronas granulares cargadas con la sonda fura-2 fueron estimuladas durante 30 segundos con NMDA a concentraciones de 50 μ M y 100 μ M tras una incubación previa de 5 min con los antagonistas: BBG 10 μ M, PPADS 30 μ M y TNP-ATP 2 μ M.

3.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS ACOPLADA A LAS PROTEÍNAS ERK1/2 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

Una vez analizada la señalización del 2MeSADP y BzATP acoplada a la proteína GSK3 centramos nuestra atención en otra proteína implicada en numerosos procesos dentro del sistema nervioso, como son las proteínas ERK1/2. Estas proteínas pertenecientes a la familia de las MAP quinasas están relacionadas fundamentalmente con vías de proliferación y diferenciación (Vaudry y cols., 2002; Botia y cols., 2007). Además y de igual manera que para la GSK3, existen numerosos antecedentes sobre el papel que juegan las proteínas ERK1/2 en el efecto neuroprotector de numerosos factores tróficos frente a diversos estímulos excitotóxicos/neurotóxicos. Por otro lado, existen puntos de convergencia entre las dos vías de señalización mediadas por la GSK3 y por las ERK. De hecho en nuestro modelo parece existir un cruce entre las dos vías, ya que la fosforilación de la GSK3 aumenta cuando la ruta de las ERK está inhibida. Todos estos datos, sumados a la larga lista de evidencias bibliográficas sobre su implicación en la supervivencia neuronal y apoptosis, nos llevaron a analizar más a fondo el efecto que los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y el BzATP, podrían tener sobre la señalización acoplada a estas proteínas así como su posible participación en efectos neuroprotectores.

3.1.- Señalización de los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP acoplada a proteínas ERK1/2 en neuronas granulares de cerebelo. Señalización mediada por los receptor P2Y₁₃ y P2X7.

3.1.1.- Fosforilación de las proteínas ERK1/2 mediada por el 2MeSADP en neuronas granulares.

Siguiendo la misma línea de investigación llevada a cabo en el estudio de la proteína GSK3, las mayores respuestas de los agonistas nucleotídicos de tipo metabotrópico sobre las proteínas ERK1/2, se obtenían con el agonista 2MeSADP. El 2MeSADP aumentaba alrededor de 2 veces los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2 en neuronas granulares (figura 29A), como ya habíamos observado en experimentos previos (apartado 1.1.3.). A diferencia de la GSK3, la fosforilación de las proteínas ERK1/2 en los residuos Thr202 y Tyr204 es una medida fiable del nivel de activación de dichas proteínas (Davis, 1995; Nishimoto y Nishida, 2006).

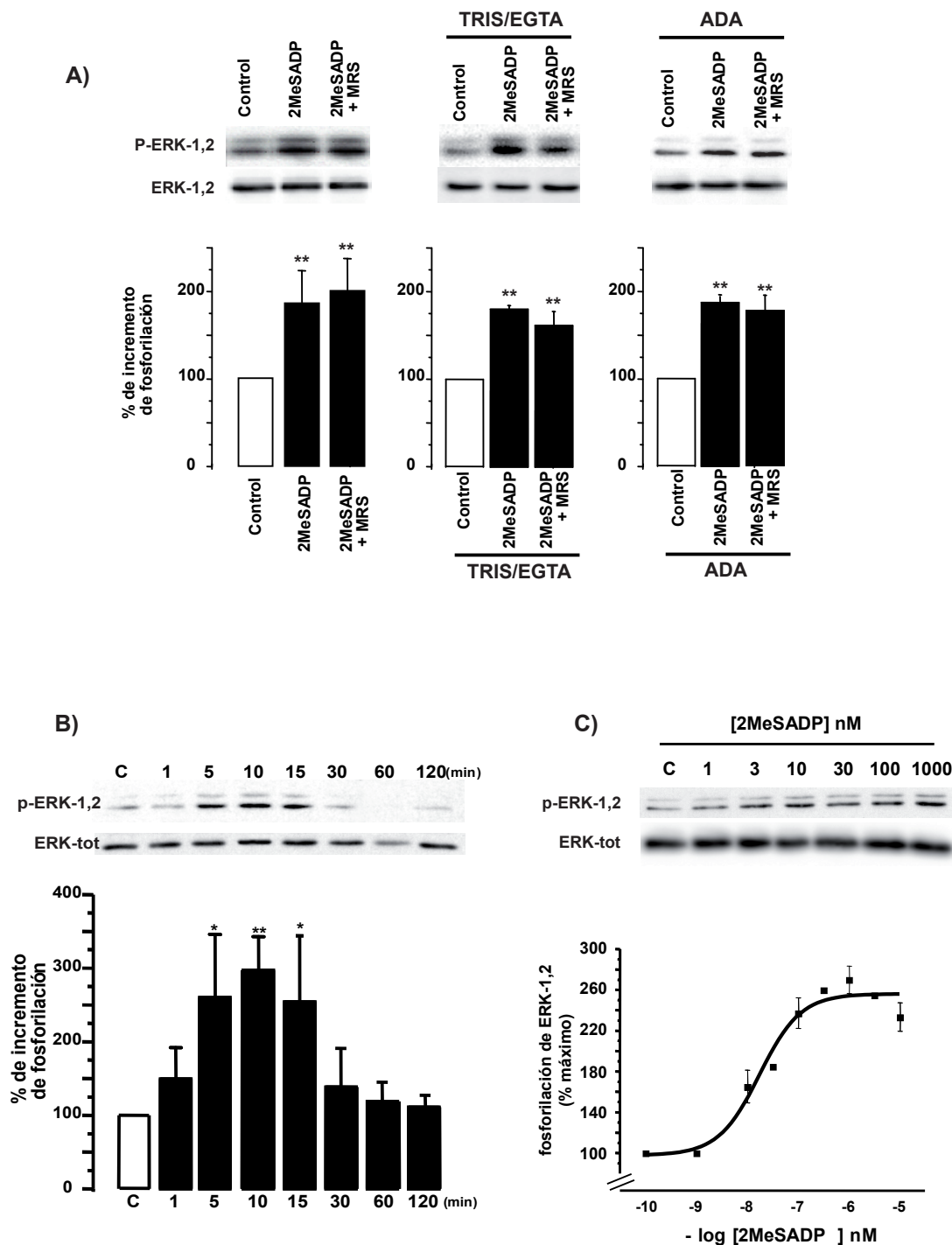


Figura 29.- Efecto del 2MeSADP sobre la fosforilación de las ERK-1/2. **A)** Las neuronas granulares de cerebelo se estimularon con 2MeSADP 1 μ M (en presencia y ausencia de MRS-2179 10 μ M). Cuando se requirió la estimulación con 2MeSADP se realizó durante 10 min en ausencia de calcio extracelular, empleando una mezcla quelante de TRIS/EGTA o bien en presencia de adenosina deaminasa (1U/mL). **B)** Las neuronas granulares se estimularon con 2MeSADP 1 μ M a diferentes tiempos de incubación. **C)** Las neuronas granulares se estimularon durante 10 min con concentraciones crecientes de 2MeSADP. Posteriormente las células fueron lisadas y se recogieron los extractos celulares donde se analizaron los niveles de fosforilación de las ERK-1/2. Los histogramas **(A)** y **(B)** muestran el porcentaje de incremento de fosforilación con respecto a las células no estimuladas (100%) y se obtuvieron normalizando los valores densitométricos de la fosfo-ERK-1,2 con respecto a los valores de ERK-1,2 total. En **(C)** las curvas se ajustaron por medio del análisis Boltzmann. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas.

Como era esperable para una respuesta de naturaleza metabotrópica, la respuesta inducida por el agonista 2MeSADP sobre las ERK1/2 se mantenía en presencia de la mezcla quelante de calcio TRIS/EGTA. Una vez más, se confirmó que la posible interacción del sistema de receptores de adenosina podía ser descartada, mediante el uso rutinario de adenosina deaminasa durante los experimentos (figura 29A).

Tampoco se observó, en lo que a efecto sobre la fosforilación de las ERK1/2 se refiere, que el antagonista específico del receptor $P2Y_1$, el MRS-2179, supusiera variación alguna de los resultados, indicando como en el caso de la GSK3, que la respuesta del 2MeSADP estaba siendo llevada a cabo por un receptor de ADP tipo $P2Y_{13}$.

Cuando se analizó la respuesta del 2MeSADP sobre la fosforilación de las proteínas ERK1/2 en función del tiempo y de la concentración de agonista, se pudo comprobar que seguía el mismo patrón observado para la fosforilación de la GSK3 (apartado 1.1.1). El incremento de fosforilación en las ERK era igualmente transitorio, observándose efectos significativos tras 5 minutos de estimulación con un pico máximo a los diez minutos, y una vuelta a los niveles basales a los 30 minutos tras la estimulación con el agonista (figura 29B). Este incremento transitorio daba aun más fuerza a la existencia de una posible función neuroprotectora de los agonistas nucleotídicos relacionada con la activación de las ERK1/2, ya que están descritas este tipo de respuestas cuando se potencia la supervivencia neuronal. (Shinozaki y cols., 2006), (Subramaniam y cols., 2003) (Subramaniam y cols., 2005). Los experimentos dosis-respuesta con 2MeSADP dieron un valor de EC_{50} de $16,21 \pm 2,6nM$ similar al observado para la fosforilación de la GSK3, y en el rango de lo descrito para receptores de ADP (figura 29C).

Cuando se realizaron experimentos con los antagonistas $P2Y$, y como era esperable, el antagonista selectivo del receptor $P2Y_1$, el MRS-2179, mencionado en apartados anteriores, no varió en absoluto los efectos ejercidos por el 2MeSADP sobre la fosforilación de las ERK1/2, como tampoco lo hizo el antagonista del receptor $P2Y_{12}$, el 2MeSAMP, ni cuando se empleó el sólo o en combinación con el MRS-2179 (figura 30A). Es importante destacar que estos antagonistas no supusieron, por sí mismos, variaciones en los niveles basales de fosforilación de las proteínas ERK1/2. Cuando se usó el antagonista selectivo del receptor $P2Y_{13}$, el MRS-2211, del mismo modo que lo observado en la proteína GSK3, incrementó por sí mismo los niveles basales de fosforilación de las ERK, anulando los incrementos producidos al estimular las células con 2MeSADP (figura 30B).

Todos estos datos en conjunto nos permitieron identificar al receptor $P2Y_{13}$ como el implicado en los incrementos de fosforilación producidos sobre las proteínas ERK1/2 al estimular las células con el agonista nucleotídico 2MeSADP.

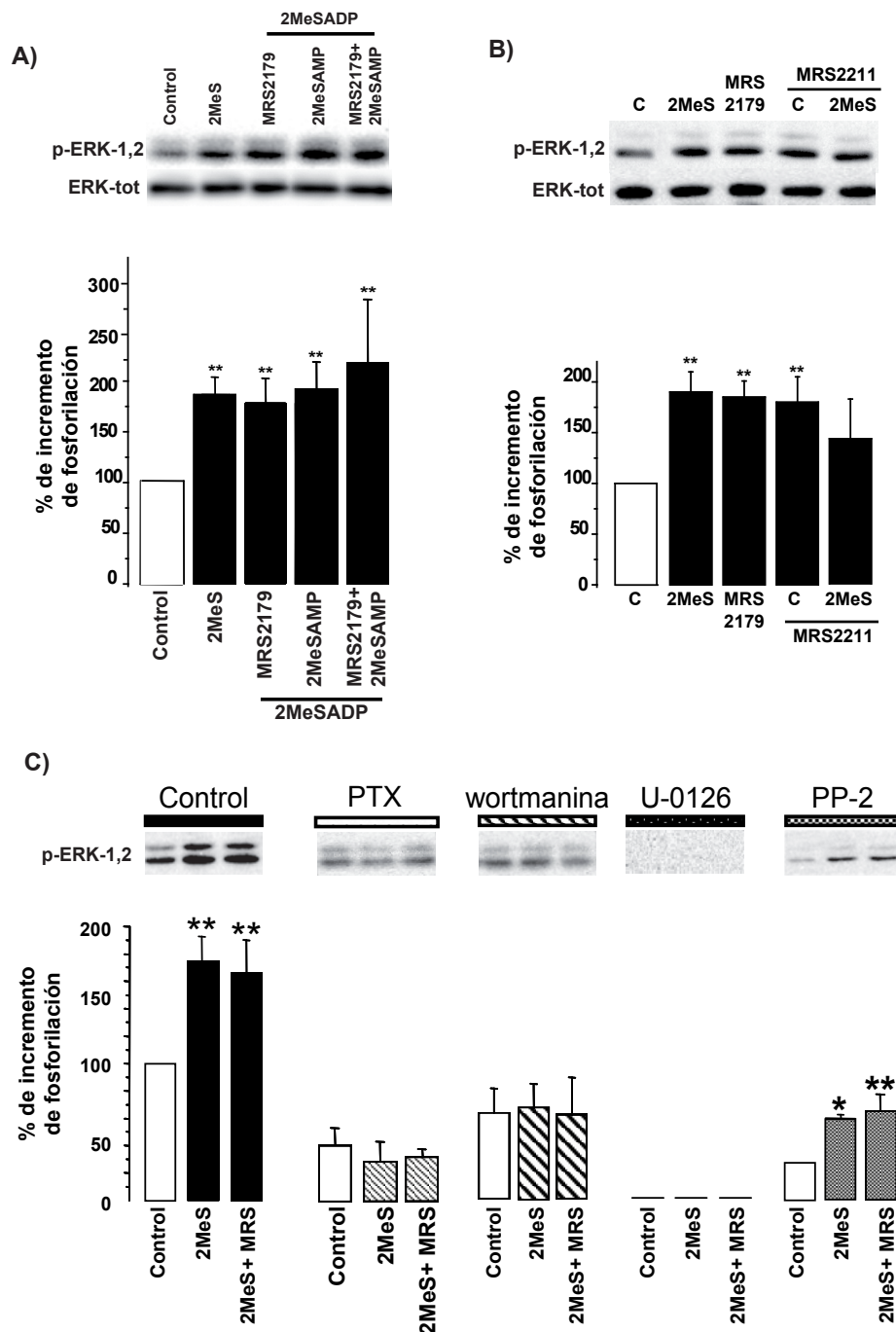


Figura 30. Efecto de distintos antagonistas de receptores nucleotídicos e inhibidores de proteínas de señalización sobre la fosforilación de las ERK-1/2 inducida por 2MeSADP Las neuronas granulares fueron preincubadas con durante 5 min con MRS-2179 10 μ M, 2MeSAMP 100 μ M, MRS-2211 10 μ M (A) y (B), antes de ser estimuladas con 2MeSADP 1 μ M durante 10 min, manteniéndose la presencia de los antagonistas durante este tiempo de estimulación. Los controles en presencia de estos tres antagonistas por si solos no supusieron cambios significativos con respecto a las células no estimuladas (100% valor control) salvo en el caso del MRS-2211 mostrado en la figura. C). Las neuronas granulares en cultivo se sometieron a diferentes tratamientos: incubación durante toda la noche con 10 ng/mL de *toxina pertussis*, y 30 minutos de incubación con los inhibidores de señalización (wortmanina 1 μ M, U-0126 10 μ M, y PP-2 1 μ M). Seguidamente las células fueron estimuladas con 2MeSADP 1 μ M en presencia y ausencia de MRS-2179 10 μ M durante 10 min, manteniéndose los inhibidores durante la estimulación. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas.

De los resultados anteriores se puede deducir que existe una gran similitud en las respuestas del 2MeSADP frente a la fosforilación de la GSK3 y de las ERK, y que ambas respuestas estarían siendo mediadas por el mismo receptor en las neuronas granulares y que este sería un P2Y₁₃.

3.1.2.- Mecanismo de señalización del 2MeSADP sobre las proteínas ERK1/2 en neuronas granulares. Dependencia de la vía PI3K/Akt.

A continuación se realizó el análisis de la vía de señalización que mediaba los efectos del 2MeSADP sobre las proteínas ERK. Con este fin se emplearon diferentes inhibidores selectivos de proteínas de transducción de señales. Como se muestra en la figura 30C la participación de un receptor metabotrópico de ADP acoplado a proteínas G_i/G_o se confirmó por medio de la utilización de la *toxina pertussis*, ya que el incremento de fosforilación de las ERK1/2 producido por el 2MeSADP se bloqueó totalmente cuando las células fueron estimuladas en presencia de la toxina. De la misma forma actuó el inhibidor de la PI3K, la wortmanina que redujo por sí mismo los niveles basales de fosforilación de las ERK1/2 y anuló cualquier incremento cuando las células fueron estimuladas por el 2MeSADP. Como era esperable, el U-0126, inhibidor de las MEK-1, quinasas responsables de la fosforilación y activación de las ERK1/2, bloqueó lógicamente cualquier fosforilación de estas proteínas haciéndolas prácticamente indetectables por inmunotransferencia, lo que confirma su especificidad por esta ruta de señalización. Por último también fue empleado el inhibidor de las src-tyrosina quinasas, el PP-2, que aunque produjo una disminución importante sobre los niveles basales de la fosforilación de las proteínas ERK, no anuló los incrementos significativos al estimular las células con 2MeSADP. Todos estos experimentos se realizaron en ausencia y presencia de en presencia y ausencia de MRS-2179, y no se observaron variaciones en la respuesta de 2MeSADP.

De estos resultados se puede concluir que el 2MeSADP está activando un receptor P2Y₁₃ en neuronas granulares, el cuál está acoplado, a través de una ruta dependiente de PI3K/Akt, a la señalización tanto de la fosforilación de la GSK3 como de las ERK1/2.

3.1.3.- Fosforilación de las proteínas ERK1/2 mediada por el BzATP en neuronas granulares.

Cuando se estudió la activación de las ERK por el agonista nucleotídico de tipo ionotrópico, BzATP, se vio que también era capaz de incrementar los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2, aunque su efecto era ligeramente menos potente que el obtenido para la fosforilación de la GSK3 (figura 31A).

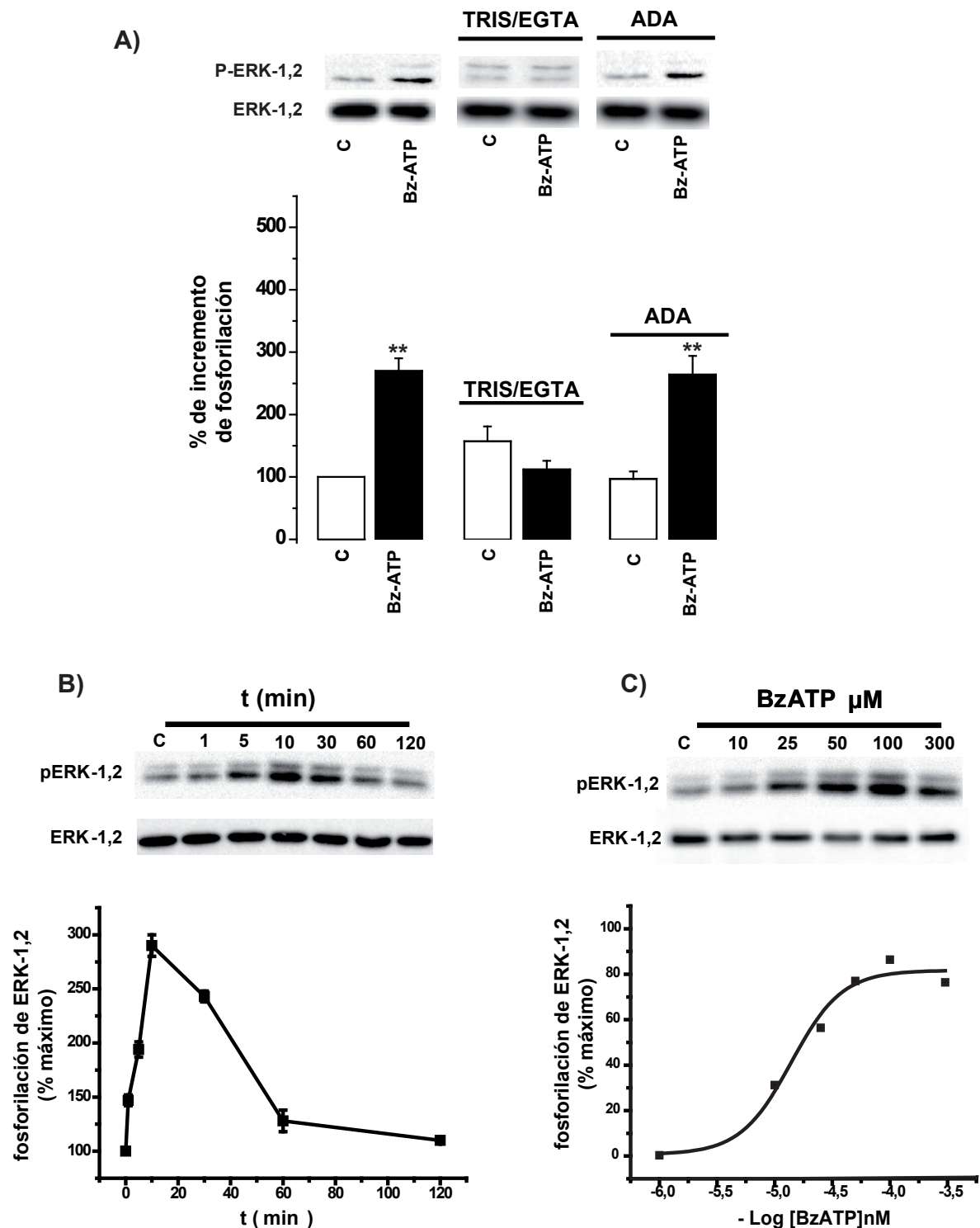


Figura 31. Efecto del BzATP sobre la fosforilación de las ERK-1/2. A) Las neuronas granulares de cerebelo se estimularon con BzATP 100μM. Cuando se requirió la estimulación con BzATP se realizó durante 10 min en ausencia de calcio extracelular, empleando una mezcla quelante de TRIS/EGTA o bien en presencia de adenosina deaminasa (1U/mL). B) Las neuronas granulares se estimularon con BzATP 100μM a diferentes tiempos de incubación. C) Las neuronas granulares se estimularon durante 10 min con concentraciones crecientes de BzATP. Los resultados se normalizaron con respecto a la máxima respuesta ejercida por el BzATP (B). En C) la curva se ajustó por medio de análisis Boltzmann. Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas.

La naturaleza ionotrópica de la respuesta se comprobó una vez más eliminando, por medio de la mezcla quelante TRIS/EGTA, la acción del calcio extracelular, mientras que se descartó la participación en la respuesta observada del sistema de receptores de adenosina por medio de la presencia en el medio de estimulación de adenosina deaminasa (figura 31A).

Las primeras diferencias en la señalización de las ERK1/2 y la GSK3 mediada por el BzATP la encontramos a nivel de la función tiempo. En comparación con la fosforilación mantenida en el tiempo de la GSK3, los incrementos de fosforilación de las ERK1/2 mediados por el BzATP eran transitorios, mostrándose incrementos significativos con tan sólo 5 min de estimulación y alcanzándose los valores máximos tras 10 min. Estos se mantuvieron hasta 30 min después de la estimulación cayendo después a valores prácticamente iniciales a los 60 min (figura 31B). La fosforilación transitoria de las ERK también se observó con el 2MeSADP, y como ya hemos indicado anteriormente, está más asociada a procesos neuroprotectores, mientras que cuando la fosforilación se mantiene constante en el tiempo, los efectos están más relacionados con la activación de las vías que desencadenan la muerte celular (Shinozaki y cols., 2006), (Subramaniam y cols., 2003) (Subramaniam y cols., 2005).

Los experimentos dosis-respuesta llevados a cabo con BzATP sobre la fosforilación de las ERK1/2 dieron un valor de EC_{50} alrededor de 14 μ M, muy cercano al obtenido para la fosforilación de la GSK3, y que está de acuerdo el rango descrito para un receptor P2X7 en este tipo de células (Figura 31C).

En los siguientes experimentos se emplearon antagonistas del receptor P2X7. En la figura 32A se muestran los resultados obtenidos al estimular las células con BzATP en presencia y ausencia de los antagonistas BBG, PPADS y A-438079, para los que es sensible el P2X7. Como podemos observar, el efecto del BzATP sobre las ERK1/2 fue completamente bloqueado por todos estos antagonistas. Si bien, de igual manera que ocurría al analizar la fosforilación de la GSK3, los niveles basales de fosforilación estaban ligeramente aumentados al usar BBG y PPADS.

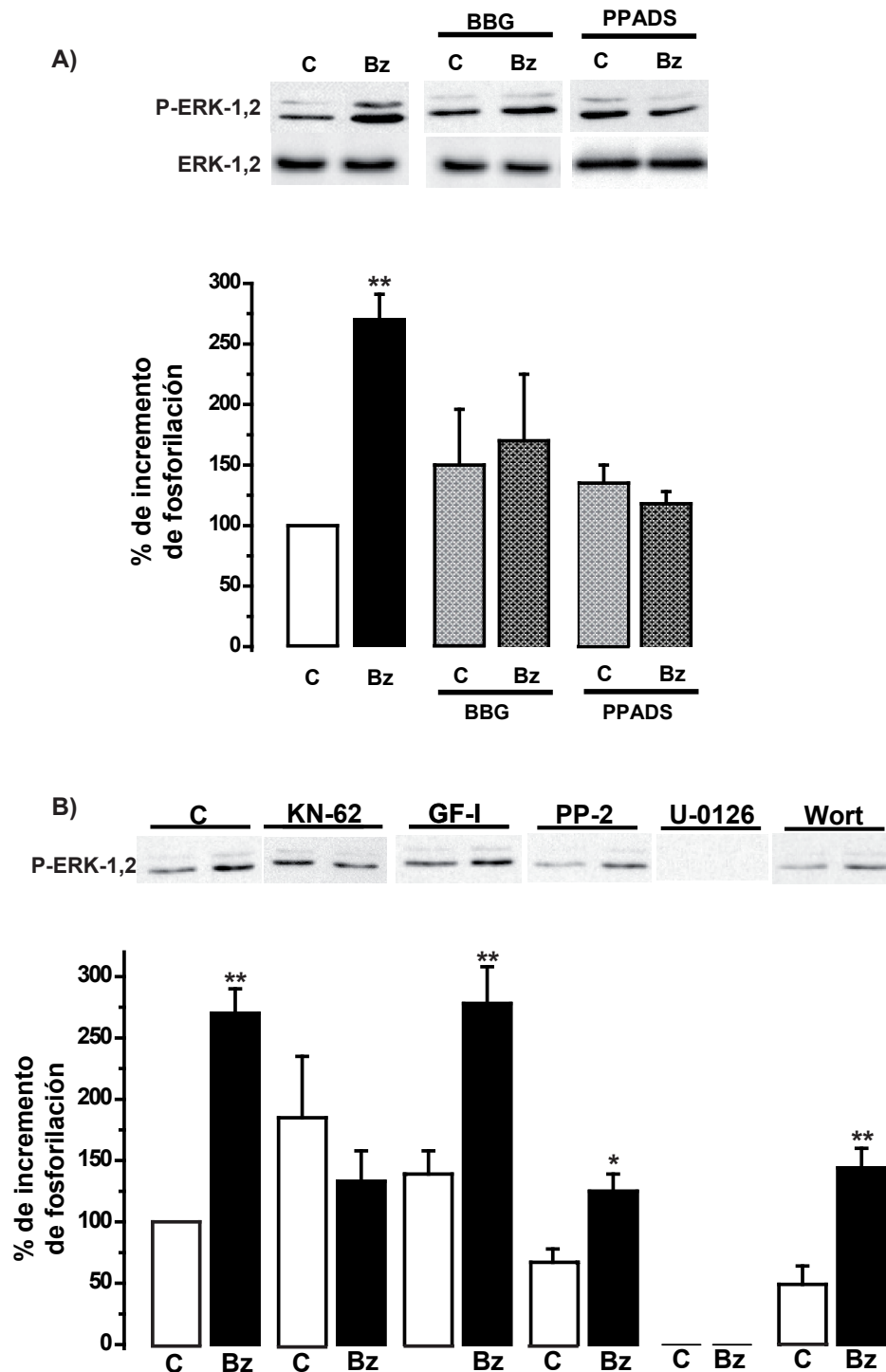


Figura 32. Efecto de distintos antagonistas de receptores nucleotídicos e inhibidores de proteínas de señalización sobre la fosforilación de las ERK-1/2 inducida por BzATP. Las neuronas granulares fueron preincubadas con durante 5 minutos con BBG 1 μ M, y PPADS 30 μ M **A)**, antes de ser estimuladas con BzATP 300 μ M durante 10 min, manteniéndose la presencia de los antagonistas durante este tiempo de estimulación. **B).** Las neuronas granulares en cultivo se sometieron a diferentes tratamientos: 30 minutos de incubación con los inhibidores de señalización (10 μ M KN-62 10 μ M, GF-I 1 μ M, PP-2 1 μ M, U-0126 10 μ M, y wortmanina 1 μ M.). Seguidamente las células fueron estimuladas con BzATP 300 μ M durante 10 min, manteniéndose los inhibidores durante la estimulación. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. Los datos se analizaron por medio del test de Dunnett y considerándose significativos estadísticamente a * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, cuando se tomaron como referencia los valores control sin estimular para cada tratamiento individual. Cuando se aplicó el test de Tukey, no se encontraron diferencias significativas entre los controles sometidos a los diferentes tratamientos.

3.1.4.- Mecanismo de señalización del BzATP sobre las proteínas ERK1/2 en neuronas granulares. Dependencia de la activación de la CaMKII.

El siguiente paso en nuestros experimentos fue comprobar cuál era la ruta de señalización que media el efecto del BzATP sobre las proteínas ERK1/2. Con esto se intentaba también aclarar más en profundidad, la relación entre las rutas de las ERK y la GSK3 activadas por el BzATP en las neuronas granulares.

Como podemos observar en la figura 32B, se emplearon inhibidores específicos de las principales proteínas de transducción de señales. A diferencia de lo observado para la señalización de la GSK3, el efecto del BzATP sobre la fosforilación de las ERK1/2 sólo se vio afectado tras el tratamiento con KN-62 y PP-2, inhibidores de la CaMKII y src-tirosina quinasas, respectivamente, siendo la inhibición total cuando se bloqueó la CaMKII. En cambio, las PKCs, que eran una señal intermedia importante en la señalización del BzATP hacia la GSK3, no parecían estar implicadas en la señalización hacia las ERK, ya que el efecto del BzATP no se modificaba con el inhibidor GF-I. Por otra parte, la ausencia de efecto del inhibidor de la PI3K, wortmanina, sí parece dejar claro que la señalización del BzATP en neuronas granulares de cerebelo es totalmente independiente de la ruta PI3K/Akt.

3.2.- Efecto protector del 2MeSADP y del BzATP frente a la excitotoxicidad mediada por glutamato en neuronas granulares de cerebelo.

Habiendo demostrado el efecto de la señalización activada por nucleótidos sobre la fosforilación y activación de las ERK1/2 y, teniendo en cuenta los antecedentes previos que relacionan la señalización de estas quinasas con la neuroprotección frente a la apoptosis inducida por glutamato, decidimos comprobar si los nucleótidos inducían algún efecto en este sentido.

Para ello se llevaron a cabo experimentos para comprobar la viabilidad celular al incubar las células durante 24 horas con 100µM de glutamato, en presencia y ausencia de los agonistas

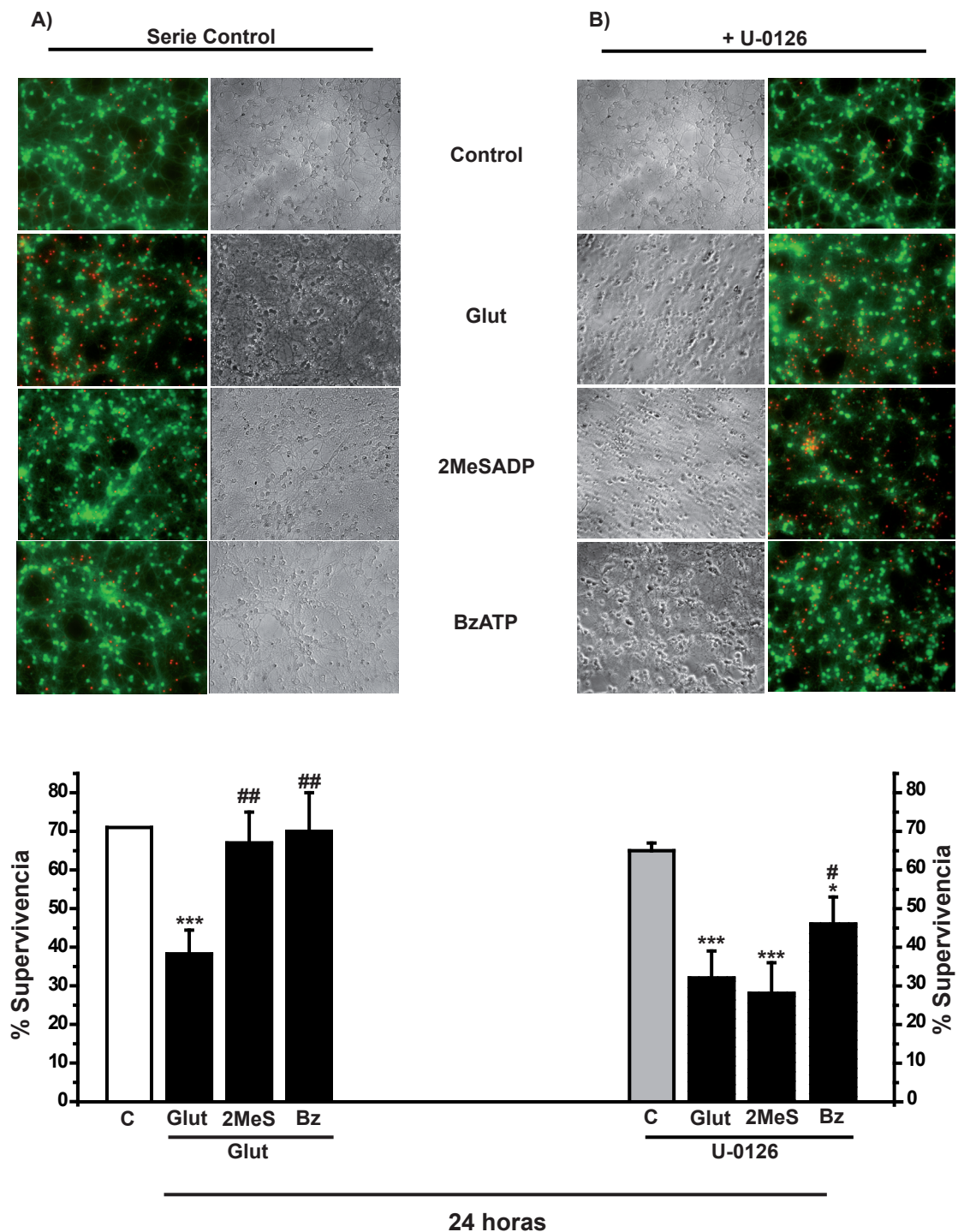


Figura 33. Efecto neuroprotector del BzATP y del 2MeSADP frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato en neuronas granulares de cerebelo. A) Las neuronas granulares cultivadas sobre cubreobjetos fueron estimuladas con 2MeSADP 1 μ M y BzATP 100 μ M durante 2 horas antes de añadir glutamato 100 μ M. La misma serie de experimentos se repitió también en presencia de del inhibidor U-0126 10 μ M (B). Tras 24 horas las células fueron sometidas a un ensayo de calceína como se describe en materiales y métodos (apartado 2.8.1). Los histogramas muestran el porcentaje de supervivencia neuronal con respecto a las células no estimuladas (control) y se obtuvieron normalizando los valores de células muertas y vivas con respecto al número de células total presente en los campos. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas y con # cuando se comparó el tratamiento con glutamato con el de los agonistas 2MeSADP y BzATP.

nucleotídicos 2MeSADP y BzATP. Como se muestra en la figura 34 el glutamato indujo un incremento altamente significativo en la muerte neuronal con respecto a las células control sin estimular, bajando los niveles de supervivencia del 70% en las control a alrededor de 40% en presencia de glutamato. Estos efectos sobre la viabilidad celular fueron completamente bloqueados cuando las células se estimularon con los agonistas nucleotídicos, tanto el 2MeSADP como el BzATP, que revertieron los valores de supervivencia neuronal prácticamente en su totalidad, alcanzando de nuevo los valores basales. Posteriormente y para demostrar la implicación de las ERK1/2 en este efecto neuroprotector se repitieron estos experimentos en presencia del inhibidor de la activación de estas quinasas, el U-0126. Este inhibidor no supuso por si mismo variaciones significativas en la viabilidad neuronal, pero bloqueó completamente los efectos neuroprotectores del 2MeSADP, en cuya presencia se alcanzaron valores semejantes de supervivencia que en las células incubadas únicamente con glutamato. En cuanto al BzATP el U-0126 redujo también significativamente el efecto neuroprotector del agonista, aunque no lo bloqueó completamente.

En conjunto estos datos indican que tanto el 2MeSADP, como el BzATP ejercen efectos neuroprotectores frente a la muerte celular que produce el glutamato sobre las neuronas granulares de cerebelo de rata. Esta neuroprotección, sería enteramente dependiente de la vía de señalización activada por las ERK1/2 en el caso del 2MeSADP, mientras que en el caso del BzATP el efecto no estaría mediado únicamente por estas quinasas, estando implicados otros mecanismos de señalización activados por el agonista del receptor $P2X_7$. Este efecto protector frente a la excitotoxicidad mediada por el glutamato se comprobó también por medio del análisis de los niveles del fragmento activo de la caspasa-3. Como se observa en la figura 34, la estimulación continuada por parte del glutamato indujo un incremento muy significativo de los niveles de caspasa-3 activos, y por lo tanto de la apoptosis, mientras que estos incrementos fueron completamente prevenidos en presencia tanto del BzATP como del 2MeSADP, confirmando el efecto neuroprotector de ambos agonistas, a través de los receptores purinérgicos $P2X_7$ y $P2Y_{13}$, respectivamente. Como control positivo se empleo el BDNF, cuyo efecto neuroprotector frente a la excitotoxicidad por glutamato en las neuronas granulares de cerebelo ha sido ya previamente descrito. (Zhu y cols., 2005).

Estos resultados tomados conjuntamente confirman que los nucleótidos actúan como importantes factores de supervivencia en las neuronas granulares de cerebelo para hacer frente

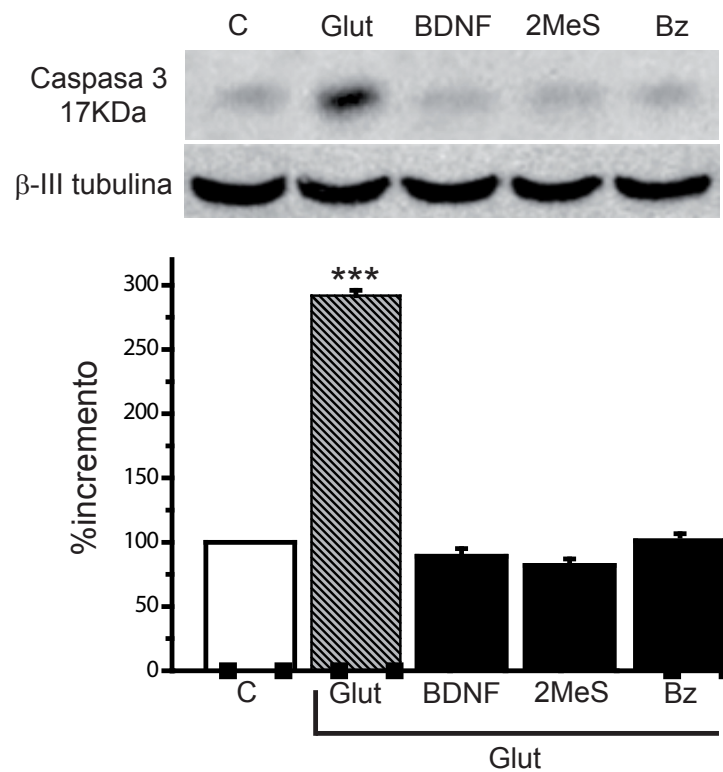


Figura 34. Efecto de la excitotoxicidad inducida por el glutamato sobre los niveles de caspasa-3 activa. Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo se estimularon con 2MeSADP 1μM y BzATP 100μM durante 2 horas antes de añadir glutamato 100μM. Los extractos nucleares se recogieron 6 horas después y se analizaron los niveles del fragmento activo de la Caspasa-3. Los histogramas muestran los porcentajes de variación con respecto a las células no estimuladas (100% valor control), y fueron obtenidas por medio de la normalización de los valores densitométricos de la caspasa-3 con respecto a los obtenidos de la β-tubulina, empleada como control de carga. Los valores mostrados corresponden a la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes de tres cultivos diferentes. La significación estadística se indica mediante * cuando se tomó como referencia los niveles correspondientes a las células control no estimuladas.

a estímulos de tipo excitotóxico, actuando sobre receptores P2Y₁₃ y P2X₇, que están acoplados a la activación de las proteínas ERK1/2.

4.- ESTUDIO DEL EFECTO A NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA SEÑALIZACIÓN ACTIVADA POR NUCLEÓTIDOS EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA.

Como se ha descrito a lo largo de este capítulo, la señalización activada por los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP inducía tanto la activación de reguladores transcripcionales, ya que el 2MeSADP propiciaba la estabilización y translocación al núcleo de la β -catenina, como la activación de sistemas neuroprotectores frente a estímulos proapoptóticos, debidos a la inhibición de la PI3K, o a la excitotoxicidad mediada por glutamato. Igualmente, ambos agonistas nucleotídicos activaban vías de señalización que producían fosforilación e inhibición de la actividad catalítica de la GSK3. Teniendo en cuenta que, como hemos citado anteriormente en el capítulo de introducción, la GSK3 regula la actividad de una gran variedad de factores de transcripción, su inhibición podría activar la expresión de numerosos genes diana de estos factores cuya actividad está habitualmente reprimida por la acción de la GSK3. Estos importantes efectos desencadenados en las neuronas granulares nos llevo a investigar si la estimulación de estas células por parte del 2MeSADP y del BzATP producía modificaciones a nivel de expresión génica. Para ello se estimularon diferentes cultivos con los agonistas y en comparación con células no estimuladas se evaluaron posibles cambios a nivel de actividad genómica utilizando la técnica de microarrays.

Durante las últimas décadas, el uso de este tipo de procedimientos de alto rendimiento en biología molecular se ha extendido enormemente. Así, ahora es posible obtener datos de expresión génica, interacciones proteicas, relaciones evolutivas y otros muchos aspectos, a escala genómica. Esto significa que mediante dichos procedimientos es posible obtener, por ejemplo, una visión de los niveles de todos los RNA expresados en una célula (transcriptoma), información sobre las interacciones entre todas sus proteínas (interactoma), o incluso la historia evolutiva de todos sus genes (filoma).

Este cambio tecnológico ha supuesto una revolución en muchos campos de la biología molecular, ya que, si bien la cantidad de información producida supera en mucho las posibilidades de un estudio detallado, su análisis bioinformático (uso de procedimientos computacionales para el análisis de datos biológicos) puede proporcionar importantes avances en el entendimiento de los procesos biológicos que rigen el funcionamiento celular. Esta visión post-genómica no sólo se ha demostrado útil en si misma, sino que permite complementar, corroborar o dirigir otros análisis experimentales.

Una de las técnicas de alto rendimiento más utilizadas con este propósito, es la técnica de *DNA microarrays*, basada en la hibridación del aislado de RNA células en cultivo, con miles de sondas especialmente diseñadas para detectar el RNA mensajero resultante de la

transcripción de cada gen. Mediante este procedimiento, es posible obtener una visión general del transcriptoma celular en un momento y condiciones concretas. Hoy en día, existen numerosos ‘chips’ genómicos preparados para medir los niveles de expresión de todos los genes de un organismo dado. Su aplicación abarca múltiples propósitos, tales como el análisis de cambios de expresión en el tiempo (DeRisi y cols., 1997), la detección de genes sobre o infra expresados bajo un tratamiento concreto, el diseño de predictores (Simon, 2005), análisis de tipo CGH (*Comparative Genomic Hybridization*), (Edelmann L, 2009) etc.

Si bien el uso de la técnica de *microarrays* permite valorar los cambios de expresión de genes concretos, generalmente resulta más informativo su estudio a escala genómica o por bloques funcionales. Para ello, es imprescindible que los resultados de expresión puedan ser cruzados con toda la información funcional disponible sobre los genes incluidos en el estudio (frecuentemente, todo un genoma). Actualmente, existen bases de datos especialmente dedicadas a anotar y categorizar los diferentes aspectos funcionales de los diferentes genes de un organismo. Entre otras, se encuentran Gene Ontology (GO) (Ashburner y cols., 2000), que recopila información sobre la Función Molecular, Proceso Biológico y Localización Celular asociados a cada gen; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa y cols., 2008), que proporciona las rutas metabólicas o enfermedades descritas para cada gen; o CisRED (Robertson y cols., 2006), que muestra los elementos regulatorios asociados a la expresión de cada gen. En suma, el estudio bioinformático de los resultados de expresión y la información funcional de los genes, permite obtener resultados sobre los aspectos funcionales que están sobre-, infra-expresados en una célula bajo una condiciones concretas.

4.1.- Modulación de la expresión génica en neuronas granulares de cerebelo activada por el agonista nucleotídico BzATP.

Inicialmente, fue llevado a cabo un estudio de expresión diferencial para evaluar las diferencias de expresión de cada gen en concreto, entre las células estimuladas con BzATP y las células control. Cuando se llevó a cabo este análisis se obtuvieron más de 450 genes significativamente sobre o subexpresados en las células estimuladas con el agonista. Sin embargo y debido al carácter genómico del estudio, que implica un tamaño muestral muy grande, se realizó un ajuste del p-valor por “*multiple testing*” para evitar la presencia de falsos positivos. Este ajuste redujo drásticamente el número de genes significativamente sobre y subexpresados, mostrándose los resultados obtenidos en la siguiente tabla.

Resultados

#NAMES	NAMES	p-value	adj.p-value
TC527939	TC527939	1.06E-06	0.018822422
Map3k8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	4.33E-06	0.039778014
Thbd	Trombomodulina	4.46E-06	0.039778014
Gadd45g	Growth Arrest and DNA Damage gene G	1.05E-05	0.073969011
Fgg	Cadena γ de fibrinógeno	1.24E-05	0.073969011
Junb	Junb	3.64E-05	0.130981695
Ier5l	Immediate early response gene 5-like protein	3.67E-05	0.130981695
Fos	Fos	5.59E-05	0.153427895
TC529780	TC529780	7.14E-05	0.159202184
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	7.14E-05	0.159202184
LOC364706	LOC364706	7.90E-05	0.165629801
Bhlhb2	Class B basic helix-loop-helix protein 2	0.000101554	0.191502241
Faslg	Ligando de Fas	0.000162318	0.251642347
TC543194	TC543194	0.000146862	0.249364005
TC520163	TC520163	0.000102043	0.191502241
BC082090	BC082090	7.09E-05	0.159202184
TC527039	TC527039	4.93E-05	0.146630463
BG375381	BG375381	4.75E-05	0.146630463
C4bpa	C4b-binding protein alpha chain Precursor	2.94E-05	0.130981695
TC539072	TC539072	2.74E-05	0.130981695
AI031053	AI031053	1.06E-06	0.018822422

Tabla 1.- Expresión génica diferencial en las neuronas granulares estimuladas con BzATP.

Posteriormente se estudió la sobre o subrepresentación de las anotaciones de proceso biológicos asociados a los genes sub y sobreexpresados respectivamente. Los datos obtenidos del análisis funcional tras la estimulación del receptor P2X7 revelaron una sobre-representación significativa de un importante grupo de clases funcionales de GeneOntology. Entre estas cabe destacar la sobre-representación de clases funcionales acopladas a la respuesta frente a ciertos estímulos apoptóticos y a otras encaminadas al crecimiento y diferenciación celular. Por ejemplo los genes más sobreexpresados tras el tratamiento con BzATP parecen estar relacionados con la respuesta al dolor (GO:0048265), a radiación (GO:0009314), a daño celular (GO:0009611,

GO:0042060), a stress (GO:0006950), también relacionadas con la diferenciación celular y con las vías asociadas al crecimiento (GO:0030154, GO: 0040008). (Figura 35). Es importante destacar que las clases funcionales sobrerrepresentadas responden al análisis conjunto de bloques de genes y no al estudio de un gen en concreto.

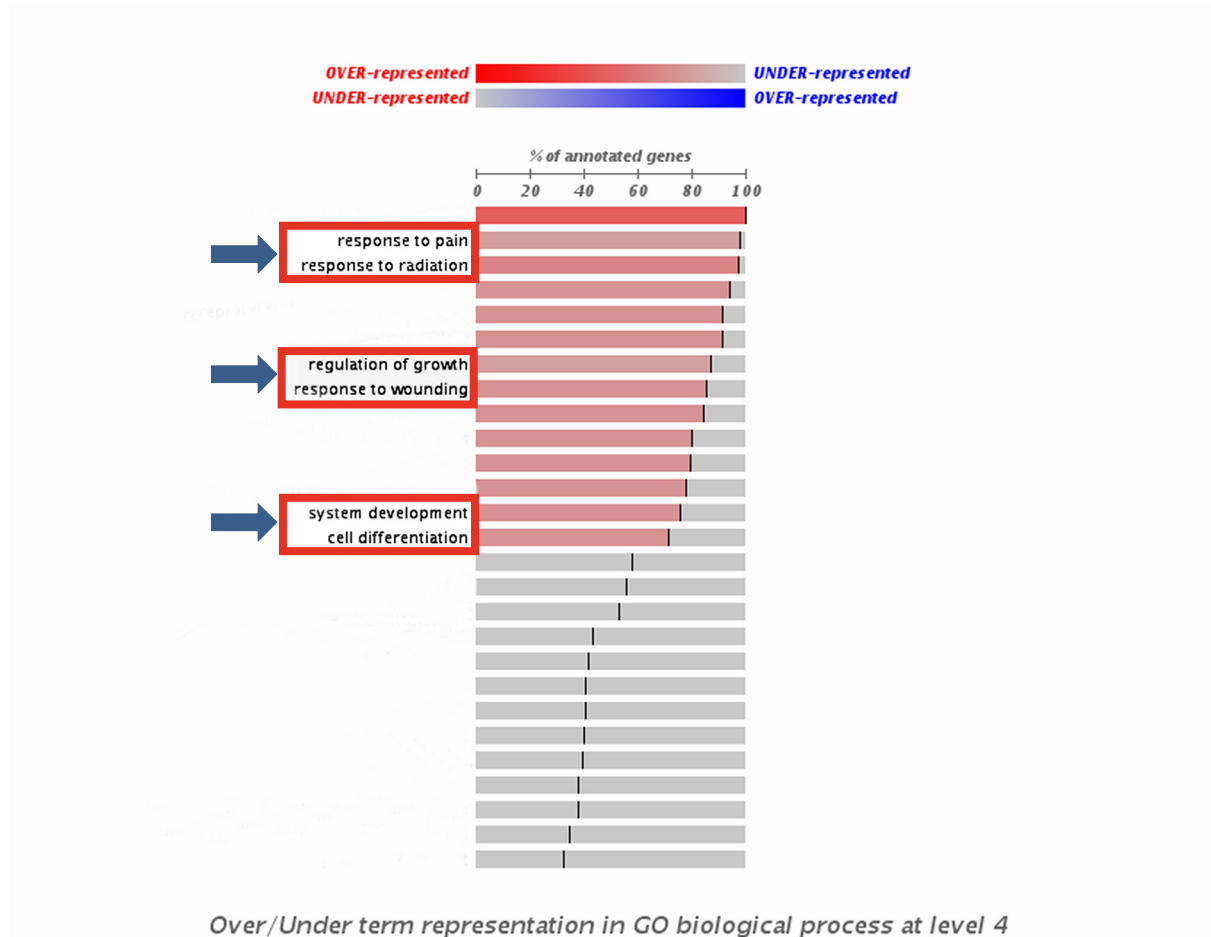


Figura 35. Términos significativos de GO de Proceso Biológico asociados a neuronas granulares control o estimuladas con BzATP.

Resultados

(Figuras 36). Cuando los análisis se realizaron basándose en la función molecular asociada a los genes, en lugar del proceso biológico, se observó una sobre-representación de, entre otras, funciones de interacción con los factores de crecimiento (GO:0005520), con los receptores acoplados a proteínas G (GO:00046914), de la actividad de citoquinas (GO:0005125), actividad de los receptores acoplados a proteínas G (GO:0001664) y actividad hormonal (GO:0005179).

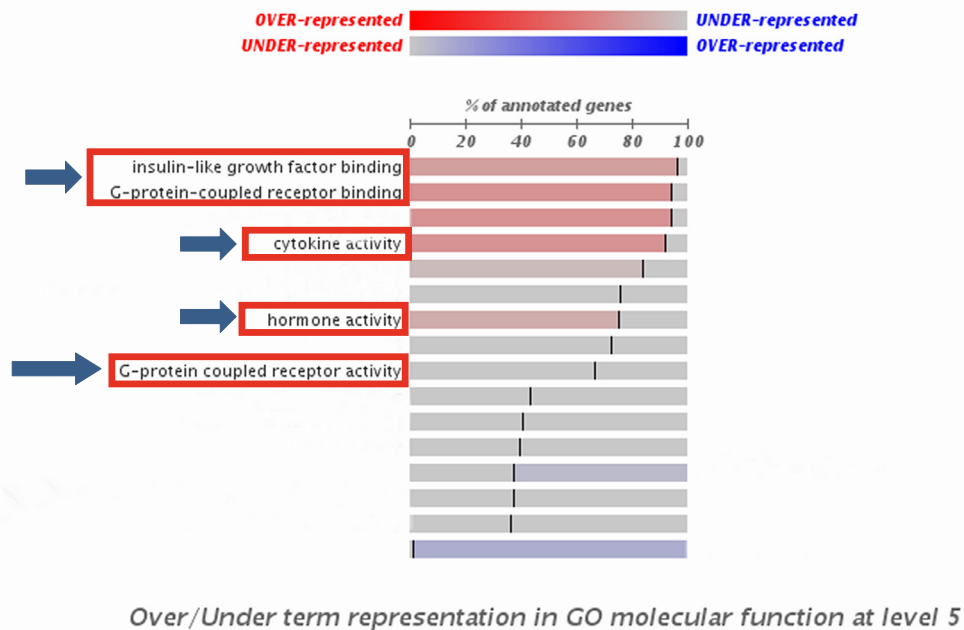


Figura 36. Términos significativos de GO de función molecular asociados a neuronas granulares control o estimuladas con BzATP.

4.2.- Modulación de la expresión génica en neuronas granulares de cerebelo activada por el agonista nucleotídico 2MeSADP.

En el caso de las células en cultivo estimuladas con 2MeSADP sometidas a los análisis de expresión génica, no se obtuvieron diferencias significativas entre las células estimuladas y las células control cuando se analizó la sobre o subexpresión a nivel de genes en concreto. Sin embargo sí se encontraron numerosos procesos biológicos sobre-representados, asociados a los genes, cuando se llevo a cabo un análisis funcional.

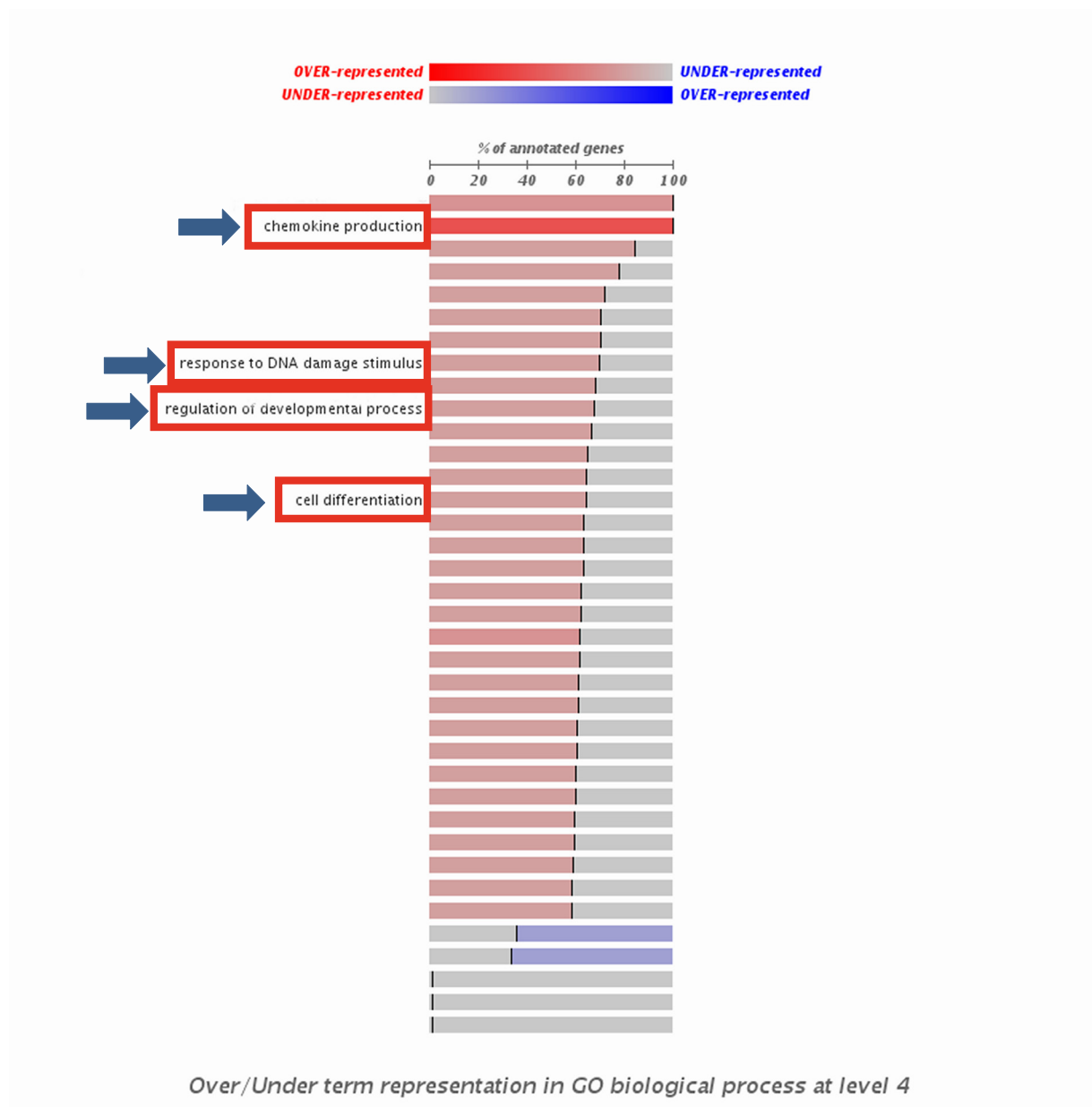


Figura 37. Términos significativos de GO de Proceso Biológico asociados a neuronas granulares control o estimuladas con 2MeSADP.

Resultados

Entre las muchas clases funcionales sobre-representadas en las células estimuladas con 2MeSADP, que pueden observarse en las figuras de este apartado, destacamos aquellas relacionadas con la producción de citoquinas (GO: 0032602), la respuesta a los estímulos causantes de daño para el DNA (GO: 0006974), diferenciación celular (GO: 0030154), regulación de procesos de desarrollo (GO: 0050793), neurogénesis (GO: 00220008), Cascadas de señalización de proteína quinasas (GO: 00072431), desarrollo celular (GO: 0048468) y desarrollo del sistema nervioso (GO: 007399). (Figura 37).

De la misma forma que en el apartado anterior, los datos se sometieron a un análisis en el que se tuvo en cuenta la función molecular asociada a los genes en cada una de nuestras muestras ya fueran estimuladas con el agonista o no. En este caso se obtuvieron también numerosas diferencias significativas a nivel de representación de determinadas funciones moleculares. De entre estas destacamos en este apartado la sobre-representación, en las células tratadas con 2MeSADP, de las funciones moleculares relacionadas con la interacción de los factores de crecimiento (GO: 0019838), interacción con DNA y RNA (GO: 0003677) (GO: 0003723), con nucleótidos de purina (GO: 00017076), con factores de transcripción (GO: 0008134) y proteínas del citoesqueleto (GO: 0008092). Figura 38.

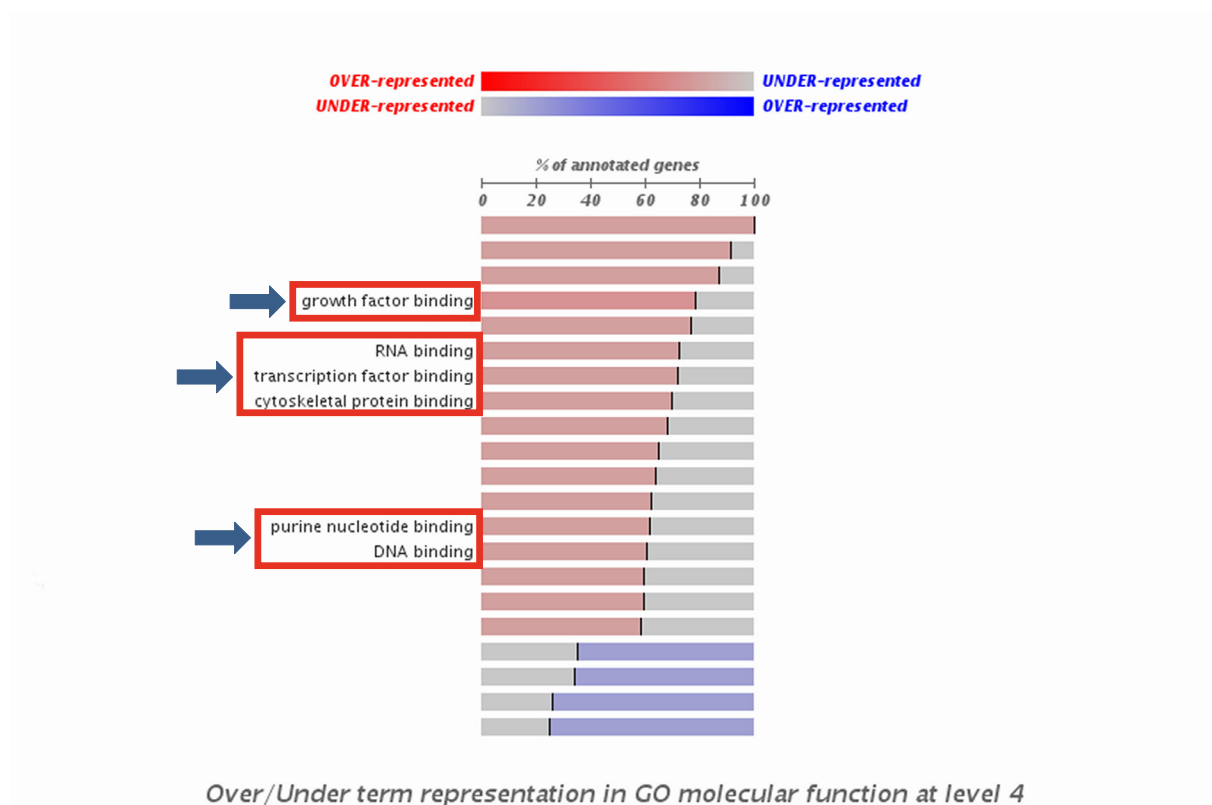


Figura 38. Términos significativos de GO de función molecular asociados a neuronas granulares control o estimuladas con 2MeSADP.

Por último el empleo de la base de datos KEGG, que muestra los datos asociados a vías de señalización en conjunto, reveló una subexpresión en las células estimuladas con 2MeSADP de las vías relacionadas con la interacción entre las citoquinas y sus receptores correspondientes. (RNO:0460). Figura 39.

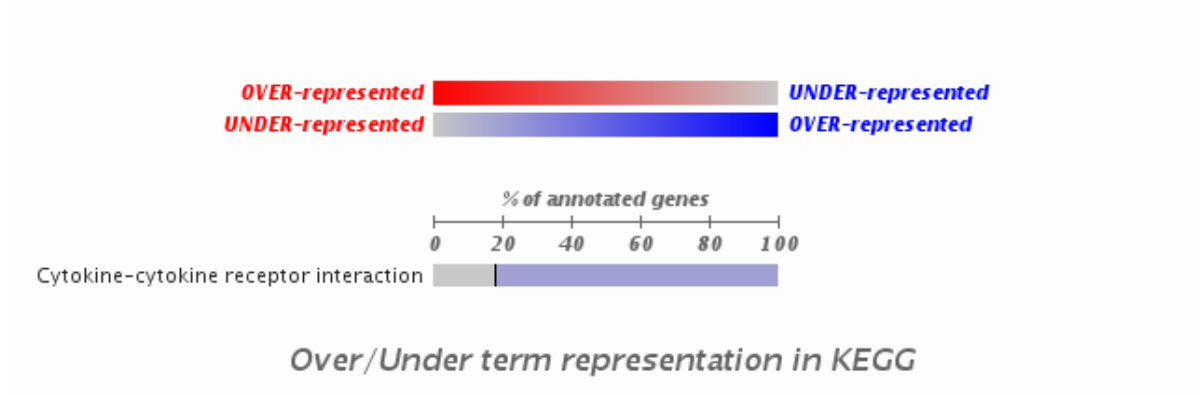


Figura 39. Términos significativos de GO de base de datos KEGG asociados a neuronas granulares control o estimuladas con BzATP.

DISCUSIÓN

1.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS ACOPLADA A LA FOSFORILACIÓN E INHIBICIÓN DE LA GSK3 EN LAS NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA.

1.1.- Señalización mediada por el receptor P2Y₁₃.

En la presente Tesis se describe el acoplamiento del 2MeSADP a una vía de señalización en la que participan tanto la GSK3 como la β -catenina en las neuronas granulares de cerebelo, a través de la activación de un receptor P2Y₁₃ acoplado a una proteína Gi.

Uno de los aspectos más relevantes del presente trabajo ha sido la identificación de un receptor P2Y₁₃ como responsable de las respuestas encontradas en la señalización del 2MeSADP hacia GSK3 y β -catenina, siendo la primera vez que se describe la presencia de un receptor de este tipo en un modelo neuronal. Esta identificación está claramente demostrada a lo largo de la Tesis con numerosas pruebas. En primer lugar, la sensibilidad de las respuestas mediadas por el 2MeSADP a la inhibición por la *toxina Pertussis*, indicaba la presencia de un receptor acoplado a Gi, del que ya se tenía constancia que estaba expresado en cerebelo, así como en otras células sanguíneas y cerebrales (Communi y cols., 2001; Hollopeter y cols., 2001; Laitinen y cols., 2001). En un principio se sospechó que podría tratarse de un receptor P2Y₁₂, que ya habíamos detectado anteriormente por RT-PCR en neuronas granulares. De hecho, en trabajos previos, dedujimos que debía existir un receptor diferente al P2Y₁ mediando los incrementos en la concentración de calcio intracelular en respuesta al 2MeSADP, ya que no se anulaban con el antagonista del P2Y₁, el MRS-2179 (Hervas y cols., 2003). La implicación del receptor P2Y₁₂, también activado por 2MeSADP, quedó descartada por la insensibilidad al antagonista específico, 2MeSAMP. El resultado de las potencias relativas observadas para el 2MeSADP y para el agonista endógeno, el ADP, que eran muy similares, y concordaban con lo que estaba descrito para los receptores P2Y₁₃ de rata, confirmó la naturaleza del receptor (Marteau y cols., 2003) (Zhang y cols., 2003) (Fumagalli y cols., 2004) (Hollopeter y cols., 2001) (Zhang y cols., 2001). Además de los datos farmacológicos, cuando se intentó detectar la expresión del receptor P2Y₁₂ a nivel de proteína, se vio que su señal era muy débil y aparentemente inespecífica, y que los receptores que sí mostraban unos niveles de expresión significativos en las neuronas granulares eran los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃.

La coexpresión de varios receptores de ADP, esta de acuerdo con lo descrito en muchos tipos celulares, lo que parece ser una pauta común para esta familia de receptores. En las células dendríticas, por ejemplo, el receptor P2Y₁₃ coexiste con otro receptor de ADP aún no identificado (Marteau y cols., 2004). También se ha descrito la coexpresión de los receptores P2Y₁ y P2Y₁₃ en los astrocitos cerebelosos, estando su señalización acoplada a la fosforilación de las ERK y a la movilización de calcio intracelular (Carrasquero y cols., 2005) (Carrasquero L. M. G., 2006). Por otro lado, los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ están también coexpresados en las células C6 de glioma junto con una gran variedad de otros receptores metabotrópicos P2Y (Nicholas

y cols., 1996b) (Tu y cols., 2000) (Czajkowski y Baranska, 2002; Czajkowski y cols., 2002). Además de estas evidencias, la coexpresión de receptores de ADP conduce, generalmente, al cruce e interacción de las vías de señalización activadas por ellos. Un buen ejemplo lo tenemos en las plaquetas donde los receptores $P2Y_1$ y $P2Y_{12}$ interaccionan recíprocamente. El $P2Y_{12}$ potencia la respuesta de calcio inducida por el $P2Y_1$ a través de la PI3K y la inhibición de la adenilato ciclasa, mientras que el $P2Y_1$ inhibe la señal del $P2Y_{12}$ a través de la activación de las quinasas Src (Hardy y cols., 2004). Igualmente estos dos receptores interaccionan en las células de astrocitoma humano 13121N1, donde el $P2Y_1$ potencia la apoptosis mediada por el $TNF\alpha$, mientras que el $P2Y_{12}$ la atenúa, por medio de una vía de señalización dependiente de PLC/PKC/ERK (Mamedova y cols., 2006). En referencia a esto, no podemos descartar la posible interacción entre los receptores $P2Y_{13}$ y el $P2Y_1$ en nuestro modelo, que será objeto de estudio en un futuro. No obstante, los datos de que disponemos hasta el momento, segregan claramente las respuestas inducidas por estos dos tipos de receptores en las neuronas granulares. De esta manera, el $P2Y_1$ sería el responsable de las acciones del 2MeSADP sobre la activación de la calcio calmodulina quinasa II y la fosforilación de la sinapsina-I, que le implicaría directamente en la posible modulación de la liberación de glutamato en estas células (Hervas y cols., 2003) (Leon y cols., 2006). En cambio, el $P2Y_{13}$ sería el receptor acoplado a la fosforilación de la GSK3, señalizando a través de la vía PI3K/Akt.

En este sentido, es importante destacar que existen numerosos ejemplos del acoplamiento de los elementos de esta vía PI3K/Akt a la señalización mediada por los receptores metabotrópicos $P2Y$, y en particular a los receptores de ADP. Por ejemplo, la activación del receptor $P2Y_1$ induce la proliferación en los fibroblastos adventiciales por medio de la activación independiente de las ERK y de la PI3K (Gerasimovskaya y cols., 2005), y el $P2Y_2$, por su parte, es capaz de activar la Akt por un mecanismo dependiente de PDK1 en las células mesangiales de rata (Huwiler y cols., 2002). En otros estudios, el receptor $P2Y_{12}$, a través de su acoplamiento Gi a una vía dependiente de PLC/PI3K/Akt, induce la quimiotaxis microglial hacia la zona de daño celular (Irina y cols., 2008). Este mismo receptor en plaquetas contribuye al mantenimiento de la fosforilación de la Akt inducida por los receptores PAR1, lo que resulta vital para la regulación de la secreción y la actividad de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (Resendiz y cols., 2007). Por último, en las células de glioma C6, los receptores $P2Y_1$, inhiben la PI3K vía $Gq/G_{11/12}$, mientras que el $P2Y_{12}$ activa la PI3K/Akt a través de un mecanismo de cross-talk con el receptor de IGF-I recientemente descrito (Van Kolen y cols., 2006) (Czajkowski y cols., 2004) (Van Kolen y Slegers, 2004).

Con respecto al papel fisiológico de la señalización mediada por los receptores tipo $P2Y_{13}$, aun son pocas las funciones conocidas asociadas específicamente a este tipo de receptor, habiéndose descrito su participación en la modulación de la liberación de ATP en eritrocitos (Wang y cols., 2005), o en la endocitosis de las HDL en hepatocitos vía RhoA/ROCKI (Malaval y cols., 2009). Mientras que en el sistema nervioso, ha sido asociado a la inhibición de la liberación de acetilcolina junto con los receptores de adenosina A1 en terminales nerviosas motoras (Veggetti

y cols., 2008), así como a la regulación de las respuestas de varios neurotransmisores en médula espinal (Heinrich y cols., 2008) e hipocampo (Csolte y cols., 2008).

En este sentido, una nueva aproximación a la función del receptor $P2Y_{13}$ la proporciona la señalización descrita en el presente trabajo para el 2MeSADP hacia β -catenina. La β -catenina es una proteína multifuncional cuya estabilidad es principalmente regulada por la GSK3 a través de la vía de Wnt. Aparte de la vía clásica de Wnt, cada vez son más los trabajos que describen la acumulación de la β -catenina en el citosol como consecuencia de la inhibición de la actividad catalítica de la GSK3, por medio de vías independientes a las de Wnt. Esto ha sido descrito para la señalización mediada para el factor de crecimiento IGF-I en células de hepatoma, para la activada por HGF en células epiteliales de mamíferos, y para el factor FGF-II en HUVEC. En todos estos ejemplos, la regulación transcripcional ejercida por la β -catenina estaba directamente acoplada a la inhibición de la GSK3, por medio de la fosforilación en residuos serina, ya que los efectos se perdían cuando se utilizaban mutantes de GSK3 no sensibles a esta inhibición de su actividad catalítica (Desbois-Mouthon y cols., 2001) (Papkoff y Aikawa, 1998) (Holnthoner y cols., 2002). Es importante destacar que la estabilización de la β -catenina inducida tanto por el IGF-I en las células de hepatoma como por el FGF en neuronas corticales, están mediadas por una vía de señalización dependiente de PI3-K/Akt (Desbois-Mouthon y cols., 2001) (Hashimoto y cols., 2002), de la misma forma que lo hemos descrito para el 2MeSADP en neuronas granulares. De hecho, aunque la inhibición a través de PI3-K/Akt de la actividad de la GSK3 no está necesariamente acoplada en todas las situaciones a la β -catenina (Ding y cols., 2000) (McManus y cols., 2005) IGF-I], esta vía de señalización parece vital para el mantenimiento de la vía de Wnt en otros sistemas (Naito y cols., 2005) (Kim y cols., 2007). A estos datos se suman los trabajos recientemente descritos en células del cáncer de colon, en las que la actividad transcripcional de la β -catenina se encuentra asociada a la actividad de determinados receptores acoplados a proteínas G, como los de PGE_2 y LPA y, parcialmente a la inhibición por fosforilación de la GSK3 (Castellone y cols., 2005) (Shao y cols., 2005) (Yang y cols., 2005). Por último, en estudios recientes en neuronas granulares de cerebelo, se ha descrito el acoplamiento de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III, a la activación de las MAPK y de la Akt, convergiendo en la translocación al núcleo de la β -catenina y en la protección contra la apoptosis inducida por la privación de los factores tróficos (Iacovelli y cols., 2002).

La β -catenina regula la transcripción de numerosos genes que están implicados en la regulación del ciclo celular, adhesión, migración y supervivencia (Novak y Dedhar, 1999) (Harris y Peifer, 2005). Los genes mejor caracterizados, como ciclina D1 y myc, que inducen la proliferación en otros tipos celulares, son aun un asunto de debate en lo que se refiere a su actividad en las neuronas. Además, la β -catenina regula dos genes relacionados con el metabolismo purinérgico que contienen zonas de unión LEF-1 en la región de su promotor. Estos son el ectoenzima 5'-nucleotidasa (CD73), y la adenosina deaminasa, que transforma

la adenosina en inosina. Estos dos genes están regulados por la vía de señalización de Wnt en direcciones opuestas lo que lleva al incremento neto de los niveles de adenosina extracelulares (Spychala y Kitajewski, 2004). A este respecto sería interesante analizar si estos dos enzimas están siendo regulados de la misma forma por el 2MeSADP en las neuronas granulares, y por tanto, si esta señalización del P2Y₁₃ contribuiría a potenciar la señalización hacia adenosina, cuyas funciones protectoras han sido previamente descritas en este modelo neuronal (Boeck y cols., 2005) (Fatokun y cols., 2008). En este sentido, los estudios de análisis de expresión génica realizados en la presente Tesis mediante los estudios de micro-arrays, suponen el punto de partida para la identificación de los genes y funciones regulados por el 2MeSADP en las neuronas granulares.

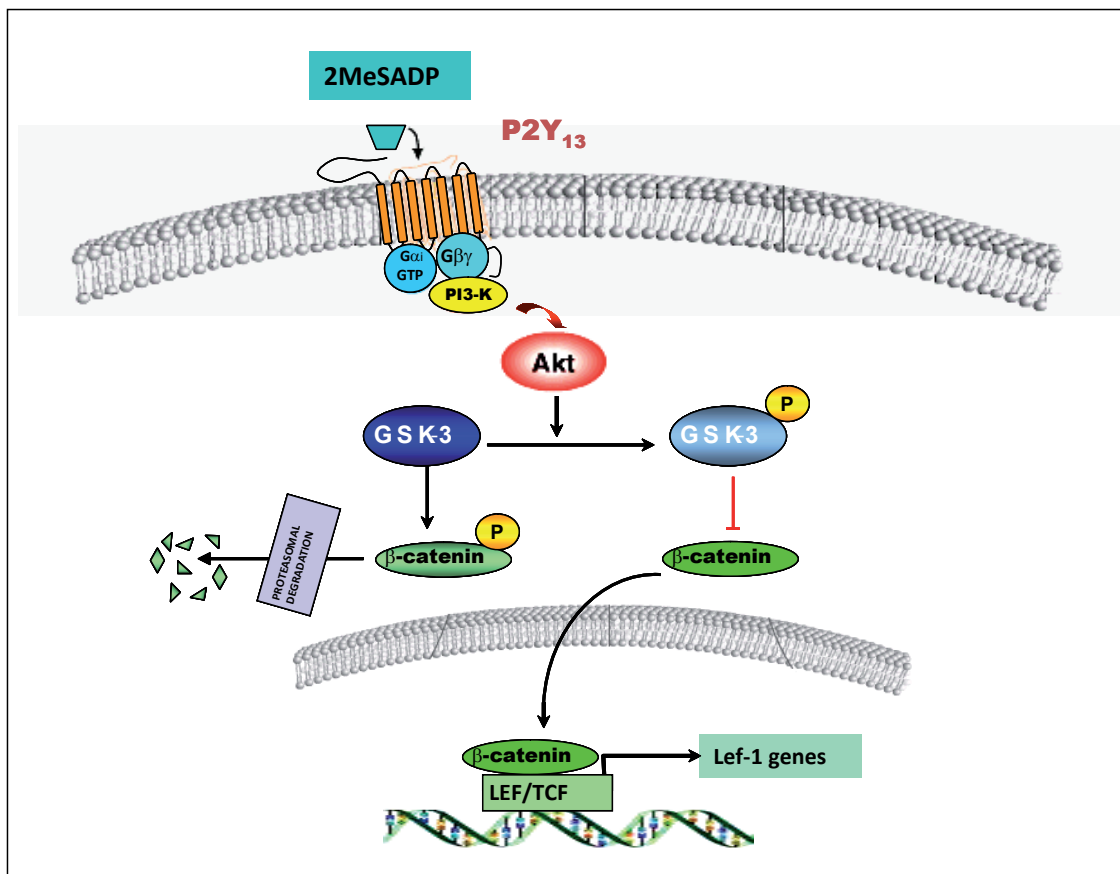


Figura 1.- Esquema resumen de la señalización mediada por el 2MeSADP hacia GSK3 en neuronas granulares de cerebelo. La activación del receptor P2Y₁₃ induce, a través de una vía mediada por PI3K/Akt la fosforilación e inhibición de la GSK3, lo que la disocia del complejo que forma con β-catenina impidiendo su degradación vía proteasoma y permitiendo a la β-catenina, estabilizarse en el citosol y translocarse al núcleo.

1.2.- Señalización mediada por el receptor P2X7.

En este apartado de la Tesis, hemos demostrado el acoplamiento del receptor P2X7 a la fosforilación e inactivación de la GSK3, a través de una vía de señalización dependiente de PKC. Esta vía de señalización supone una alternativa a la vía principal de supervivencia PI3K/Akt usada por los factores tróficos en las neuronas granulares de cerebelo, y media los efectos neuroprotectores del BzATP frente a la inhibición farmacológica de la PI3K. Estos datos refuerzan la hipótesis del papel de la señalización activada por nucleótidos en la protección y supervivencia neuronal, actuando por ellos mismos o en combinación con los factores tróficos.

Los datos farmacológicos prueban que el receptor sobre el que está actuando el agonista nucleotídico BzATP en las neuronas granulares es un receptor tipo P2X7. A este respecto hay que señalar que estas células coexpresan varios tipos de receptores P2X, como P2X1, P2X2, P2X3 y P2X4, y que todos ellos podrían contribuir de alguna manera a las respuestas del BzATP. Para algunos de estos receptores, como el P2X1/3 y P2X7, ya se habían descrito respuestas a nivel de la entrada de calcio en terminaciones nerviosas de cerebelo (Hervas y cols., 2003, 2005). Además, tanto el agonista general, ATP, como el agonista específico de los receptores P2X1 y P2X3, el α,β -meATP (Valera y cols., 1994), fueron capaces de inducir aumentos en la fosforilación de la GSK3 similares a los obtenidos por el BzATP. Sin embargo, cuando se estudió la señalización mediada por el BzATP, los experimentos se realizaron en condiciones en que se pudieran potenciar sus efectos sobre un receptor P2X7, esto es, en ausencia de Mg^{2+} , ya que este receptor es particularmente sensible a la inhibición por este catión divalente (Virginio y cols., 1997).

Bajo estas condiciones, se encontró de manera inequívoca un perfil farmacológico para el BzATP que encaja perfectamente con el correspondiente a un receptor P2X7. Primero, los valores de EC_{50} observados para el BzATP (micromolar bajo) se correspondían con lo descrito para el receptor P2X7 de rata (Young y cols., 2007). Segundo, las respuestas a BzATP eran sensibles a los antagonistas específicos del receptor P2X7 (BBG, A-438079) (Jiang y cols., 2000a) (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007), e insensibles a los antagonistas de receptores P2X1/3 (TNP-ATP) (Virginio y cols., 1998b). Además, también se bloqueaban con otros antagonistas menos específicos, como el PPADS, que nos sirvieron para descartar la posible contribución del receptor P2X4, que no se afecta por este compuesto en rata (Buell y cols., 1996). Y tercero, el hecho de que el efecto del ATP sobre la fosforilación de la GSK3 siguiera aumentando a concentraciones de 1mM, está de acuerdo con la activación de un receptor P2X7 en este rango de concentraciones, ya que el P2X7 exhibe una afinidad mucho menor por el ATP que por otros receptores P2X, que ya estarían saturados a la concentración de ATP 100 μ M. Además de esto, es importante destacar que ni el ATP 100 μ M, ni el agonista específico P2X1/P2X3, α,β -meATP,

fueron capaces de reproducir los efectos neuroprotectores ejercidos por el BzATP frente a la inhibición farmacológica de la PI3K. Es más, la pérdida de los efectos protectores del BzATP que se observaba en estadíos más largos del cultivo, concordaba perfectamente con la caída en los niveles de expresión del receptor P2X7 a 14 DIV, en comparación con los otros receptores P2X (P2X1, P2X3, P2X4), cuya expresión se mantenía sin variaciones aparentes. No obstante, no se puede descartar del todo la posibilidad de que las respuestas que estemos viendo con el BzATP sean el resultado de la interacción del P2X7 con otros receptores P2X presentes en las neuronas granulares, o incluso, de que estén formando receptores heteroméricos, como los recientemente descritos P2X1/P2X4 (Nicke y cols., 2005), P2X4/P2X7 (Guo y cols., 2007) y P2X1/P2X5 (Lalo y cols., 2008), que exhiben características farmacológicas mixtas.

La expresión del receptor P2X7 en el sistema nervioso ha sido siempre un tema de controversia y polémica. Durante un tiempo, este receptor fue considerado restringido únicamente a las líneas celulares del sistema inmune y sanguíneo, admitiéndose únicamente su presencia en el sistema nervioso asociado a las células gliales y a procesos proinflamatorios y apoptóticos (Collo y cols., 1997) (Di Virgilio, 2007). Sin embargo hoy en día la presencia del receptor P2X7 en neuronas es un tema fuera de toda duda, habiéndose descrito y confirmado, gracias al trabajo de este grupo de investigación (Miras-Portugal y cols., 2003), su presencia en neuronas tanto a nivel pre como postsináptico, donde median importantes funciones que no están relacionadas únicamente con procesos de muerte celular, como se ha comentado anteriormente (Alloisio y cols., 2008) (Armstrong y cols., 2002) (Hervas y cols., 2005) (Atkinson y cols., 2002) (Atkinson y cols., 2004) (Franke y cols., 2005) (Leon y cols., 2008) (Diaz-Hernandez y cols., 2008) (Sperlagh y cols., 2006) (Ortega, 2009). Recientemente gracias a los modelos de estudio de expresión de este receptor, generados en el NIH, asociando la GFP (Green fluorescent protein) bajo el promotor del P2X7, se ha demostrado la abundante presencia de este receptor en neuronas (mostrados en la pagina www.gensat.com).

En la presente Tesis Doctoral demostramos una nueva vía de señalización acoplada a la activación del receptor P2X7, que implica a la GSK3. El acoplamiento de los nucleótidos a la proteína GSK3 se describió primeramente en los astrocitos corticales (Neary y Kang, 2006) donde se activaba una vía dependiente de PKC que parecía estar relacionada con la inhibición de la GSK3 y la inducción de efectos protectores frente al estrés mecánico, de manera semejante a lo observado en nuestro trabajo. Otros muchos estudios han relacionado el acoplamiento a la activación de las proteínas PKC con el mecanismo de acción del P2X7 en distintos modelos celulares. Así, el P2X7 induce la translocación transitoria a la membrana de las isoformas dependientes de calcio PKC α y PKC β II en osteoclastos, donde participa en importantes procesos de la remodelación ósea (Armstrong y cols., 2009). Igualmente, el P2X7 activa, vía PKC, a las proteínas PKD y ERK1/2 (Bradford y Soltoff, 2002), y está implicado en la regulación de la secreción de saliva en las glándulas submaxilares de ratón (Nakamoto y cols., 2009). Por último, el P2X7 es el responsable de la activación de la PLD, por una vía

dependiente de PKC γ , CaMKII y tirosina quinasas, (Sun y cols., 1999) (Hung y Sun, 2002), así como de la regulación de la liberación de GABA y la expresión de TGF- α 1 en astrocitos RBA-2 tipo 2 (Hung y cols., 2005).

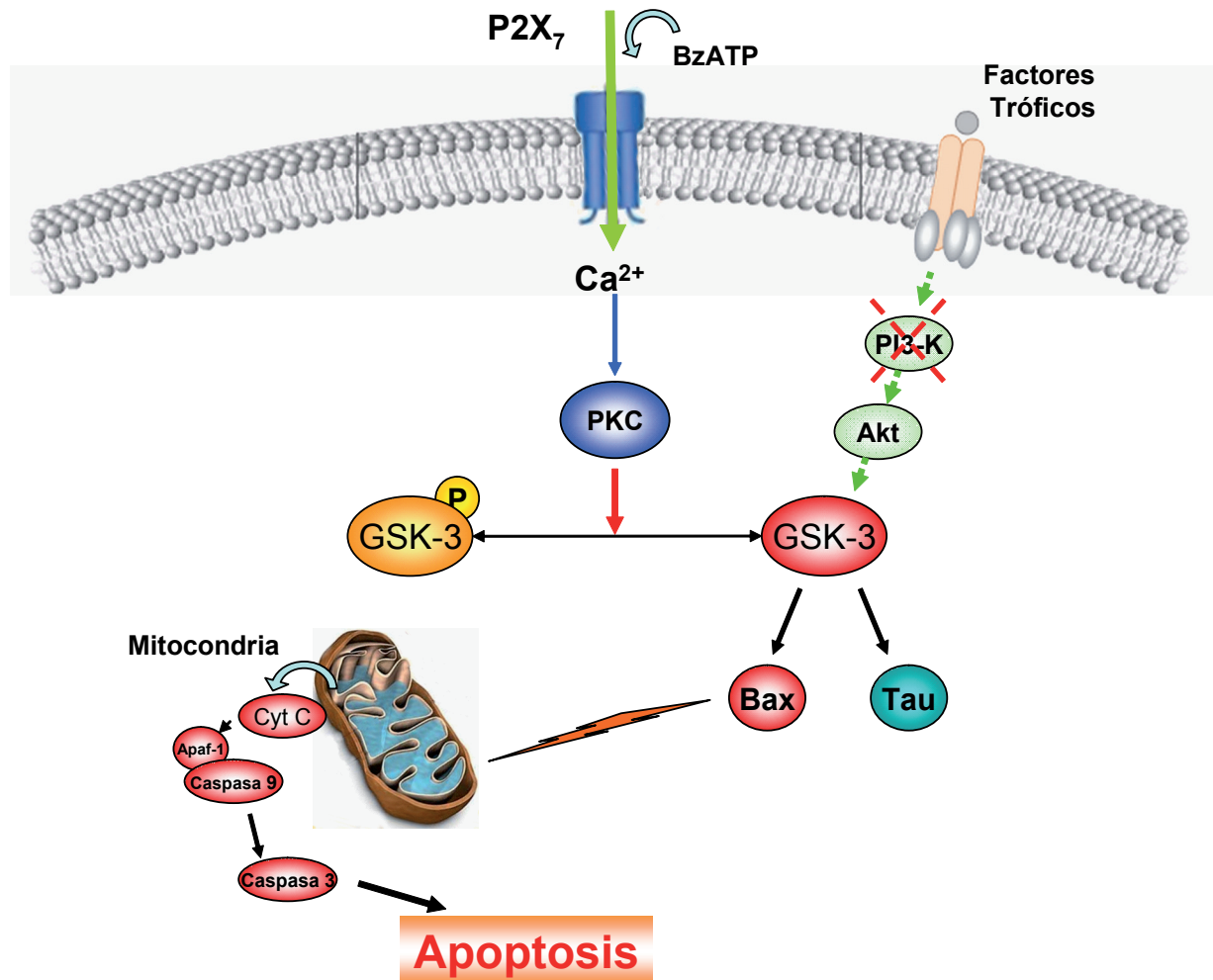


Figura 2.- Esquema resumen de la señalización mediada por el BzATP hacia GSK3 en neuronas granulares de cerebelo. La activación del receptor P2X7 induce la fosforilación e inhibición de la GSK3 a través de una vía dependiente de Ca^{2+} y PKC. Esto evita la fosforilación ejercida por GSK3 sobre la proteína Tau al igual que previene en parte la activación de las caspasa-3, principal efector de la apoptosis inducida en este modelo neuronal por la inhibición farmacológica de la PI3K.

También existen en la literatura numerosos trabajos que relacionan a la proteína PKC con la GSK3. De hecho, numerosas isoformas son capaces de fosforilar e inactivar a la GSK3 tanto *in vivo* como *in vitro* (Goode y cols., 1992) (Fang y cols., 2002). En las neuronas hipocámpales, activadores directos de PKC, como los ésteres de forbol, inducen la fosforilación en serina de la GSK3 y la estabilización de la β -catenina en el citosol, demostrando que varios miembros de la vía de señalización de Wnt están regulados por las PKCs (Garrido y cols., 2002). Asimismo, la inhibición farmacológica de la PKC en células de mieloma múltiple disminuye la fosforilación, tanto de la Akt como de la GSK3, incrementando la apoptosis de las células tumorales (Neri y

cols., 2008). Además de estas evidencias, varias vías de señalización extracelular son capaces de emplear rutas dependientes de PKC/GSK3, como las activadas por LPA en células Swiss 3T3 (Fang y cols., 2002), y por neurotensina en células de cáncer de colon (Wang y cols., 2006b). En este mismo sentido, los receptores muscarínicos y de PDGF colaboran en la inhibición de la GSK3 vía PKC, y este mecanismo es responsable de la regulación de la proliferación de los miocitos de las vías respiratorias (Gosens y cols., 2007).

Además de la señalización implicada, otro de los elementos novedosos de este trabajo es el efecto neuroprotector descrito para el BzATP en las neuronas granulares de cerebelo, que parece estar directamente relacionado con la fosforilación e inhibición de la actividad catalítica de la GSK3 mediada por este nucleótido. Como hemos indicado anteriormente, la GSK3 es un elemento clave en la regulación del equilibrio entre apoptosis y supervivencia en los modelos neuronales. De hecho, la sobreexpresión de la propia GSK3, puede conducir por sí sola a la apoptosis, como se ha descrito en neuronas corticales (Pap y Cooper, 1998) (Hetman y cols., 2000). En nuestro modelo de las neuronas granulares, está bien caracterizado que los distintos factores neurotróficos y de supervivencia (Litio, alto potasio, IGF-I, NMDA, AMPc), utilizan una vía PI3K/Akt dependiente, para converger en la inhibición de la GSK3 (D'Mello y cols., 1993) (D'Mello y cols., 1994) (D'Mello y cols., 1997) (Miller y cols., 1997) (Subramaniam y cols., 2003) (Subramaniam y cols., 2005) (Wiedmann y cols., 2005) (Patapoutian y Reichardt, 2001) (Lim y cols., 2008) (Wang y cols., 2006a) (Chin y D'Mello, 2004). En este sentido, la GSK3 parece ser la principal mediadora de la apoptosis cuando se produce la privación de factores tróficos, lo que puede ser reproducido por medio de la inhibición farmacológica de la PI3K (Hetman y cols., 2000), como ocurre en el trabajo realizado en esta Tesis. Es precisamente la independencia de la vía PI3K/Akt, lo que constituye una clara ventaja para el BzATP a través del P2X7 en las neuronas granulares de cerebelo, ya que este nucleótido es capaz de mantener inhibida a la GSK3 en condiciones en las que la principal vía de supervivencia, el eje PI3K/Akt, se encuentra inactivada o reducida. Esto podría suponer una nueva ventaja en situaciones patológicas donde se dan estas circunstancias, como ocurre en la degeneración axonal de motoneuronas en la esclerosis lateral amiotrófica (Fischer y Glass, 2007) o en la enfermedad de Alzheimer, donde las neuronas están mucho más sensibilizadas a la apoptosis, inducida por la privación de factores tróficos, entre otras causas (Guo y cols., 1997).

El papel de la GSK3 como uno de los principales efectores de la apoptosis, se basa en su capacidad para potenciar la vía intrínseca de la misma, dependiente de las caspasas mitocondriales y de la regulación de factores de transcripción. La GSK3 está relacionada con la apoptosis inducida por múltiples tipos de estímulos proapoptóticos, como daño del DNA, (Beurel y cols., 2004) (Tan y cols., 2006), toxinas mitocondriales (King y Jope, 2005), ceramidas (Mora y cols., 2002), shock térmico (Bijur y cols., 2000), etc. Por el contrario, su inhibición está asociada a la protección neuronal frente a varios de estos estímulos de muerte (Beurel y Jope, 2006). Basándonos en estos datos podemos decir que el BzATP induciría el aumento de la

supervivencia neuronal por medio de la fosforilación inhibidora de la GSK3 y de la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis, lo que se refuerza con lo observado en el apartado 1.2.5. de Resultados, donde el BzATP fue capaz de reducir los niveles del fragmento activo de la caspasa-3, establecido como el efector mayor y último de esta vía de muerte (Yakovlev y Faden, 2001). Además, la participación de la GSK3 en la vía intrínseca mitocondrial de apoptosis también se ha confirmado recientemente al identificarse a la proteína Bax, componente de esta cascada apoptótica, como sustrato directo de la propia GSK3, que la fosforila y activa dirigiéndola a la mitocondria (Linseman y cols., 2004). Si el BzATP es capaz de actuar sobre estos u otros efectores mitocondriales o actuar a nivel de la transcripción de determinados genes antiapoptóticos será objeto de estudios futuros.

1.3.- Sinergismo entre el BzATP con el NMDA y BDNF.

Las acciones del NMDA y del BDNF en el mantenimiento y supervivencia neuronal han sido ampliamente estudiadas en varios modelos neuronales (Yamagishi y cols., 2003). Para ambos factores, la ruta PI3K/Akt ha sido particularmente caracterizada, y parece ser una ruta clave en sus efectos neuroprotectores, sobre todo frente a la retirada de factores tróficos (Hetman y cols., 1999; Yamada y cols., 2001). No obstante, hasta ahora no se había profundizado de manera muy clara en la señalización de NMDA y BDNF hacia GSK3, aún siendo este enzima la etapa siguiente obligatoria a la activación de la Akt. En el presente trabajo se ha estudiado su acoplamiento en neuronas granulares de cerebelo a la fosforilación e inhibición de la GSK3, y se ha visto que de este mecanismo dependen sus efectos neuroprotectores. Pero además, al profundizar en sus mecanismos de señalización hacia la GSK3, se ha podido ver que, aunque transcurren normalmente a través del eje PI3K/Akt, tanto NMDA como BDNF pueden utilizar nuevas rutas alternativas de supervivencia que implican otras cascadas dependientes de PKC y ERK.

De acuerdo con los resultados obtenidos en neuronas granulares en el presente trabajo, el NMDA puede utilizar dos rutas diferentes para llegar a la GSK-3, una dependiente de PI3K y otra dependiente de PKC. Cuando una de ellas está inactiva, como sucede durante el tratamiento con el LY-294002, el NMDA puede seguir fosforilando e inhibiendo a la GSK3 a través de un mecanismo dependiente de PKC, y esto explica sus efectos protectores cuando se inhibe la PI3K. El hecho de que el BzATP y el NMDA compartan la misma vía de señalización PKC/GSK3, es la razón del efecto sinérgico entre ambos factores, efecto que sólo se observa a concentraciones submáximas, y que se ha visto tanto a nivel de la señalización de la GSK3, como de los efectos neuroprotectores.

Nuestros resultados con el BzATP y el NMDA apuntan a una interacción a nivel de los mecanismos de señalización entre dos receptores de tipo ionotrópico. Otros ejemplos de este tipo de interacciones las tenemos entre receptores P2X y receptores nicotínicos y de GABA, que implican tanto acciones potenciadas (Díaz-Hernández y cols., 2006), como mutuamente oclusivas (Khakh y cols., 2005) (Boue-Grabot y cols., 2004). En el caso del receptor de NMDA, se ha visto que existe cooperatividad con el ATP en la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en neuronas hipocámpales (Fujii y cols., 2002) (Pankratov y cols., 2002). En nuestro trabajo, parece que la interacción entre el receptor P2X7 con el de NMDA puede producirse en las primeras etapas o cascadas iniciadas por ambos factores, a nivel de la señal de calcio. Si bien, se ha descrito que el propio ATP extracelular puede actuar como un modulador alostérico más del receptor de NMDA, de igual manera que el Mg^{2+} o la glicina (Kloda y cols., 2004), parece claro que la interacción a nivel de la respuesta de calcio observada en este trabajo no tendría que ver con un mecanismo de este tipo, sino con un proceso mediado a través del propio receptor P2X7, ya que se bloquea por los antagonistas BBG y PPADS. Será necesario profundizar en este aspecto para comprender este tipo de interacción y su significado fisiológico.

Con respecto a la señalización del BDNF hacia GSK3, nuestros resultados están de acuerdo con el de otros autores, confirmando que su señalización parece totalmente dependiente de la PI3K. Sin embargo, el BDNF es capaz de proteger frente a la inhibición de la PI3K, porque utiliza otra vía diferente para llegar a la GSK3 que se dispara en estas condiciones, y que hemos demostrado que depende de las ERK y de la PKC. En efecto, la fosforilación y activación de las ERK-1,2 inducida por BDNF es independiente de la PI3K, y por tanto, estas proteínas pueden proporcionar una vía alternativa para llegar a la GSK3.

Nuestros resultados están de acuerdo con los estudios realizados en neuronas corticales han puesto de manifiesto que el BDNF puede poner en marcha la ruta de las ERK para seguir protegiendo frente a la retirada de factores tróficos, cuando la PI3K está inactivada (Hetman y cols., 2002). En este mismo modelo neuronal, se ha propuesto un mecanismo mediante el cual, las ERK modularían de manera inhibitoria la actividad GSK-3, a través de la formación de complejos entre ambas proteínas, más que a través de la fosforilación en serina (Hetman y Gozdz, 2004 Habas, 2006, 335). Por tanto, no se puede descartar que un mecanismo similar esté operando en nuestro modelo de neuronas granulares. Además, el hecho de que aumenten los niveles basales de fosforilación de la GSK3 siempre que se inhiben las ERK con el U-0126, indica que en neuronas granulares existe un mecanismo de cross-talk muy importante entre ERK y GSK3. Esta versatilidad que parece presentar el BDNF para emplear una determinada ruta de señalización u otra dependiendo del tipo de estímulo apoptótico o de estrés, ya se había descrito en neuronas corticales. En este sentido, cuando todas las vías están funcionales, el BDNF elige la ruta PI3K/Akt para hacer frente a la retirada de factores tróficos, y utiliza las ERK para proteger frente a los agentes que dañan el DNA (Hetman y cols., 1999).

Otro aspecto importante de la señalización del BDNF descrito en este trabajo es su dependencia de la PKC, que la sitúa como etapa anterior a las MAPK y la GSK3. Esto está de acuerdo con lo descrito en neuronas granulares y corticales, en las que la activación de los receptores TrkB induce la fosforilación de la PLC γ y la consiguiente activación de la PKC, que a través de Raf llega a las MAPK, según el esquema que se presenta en la figura X. Esta ruta ya se sabe que participa en la supervivencia inducida por el BDNF en las neuronas granulares frente a la retirada de suero (Zirrgiebel y cols., 1995).

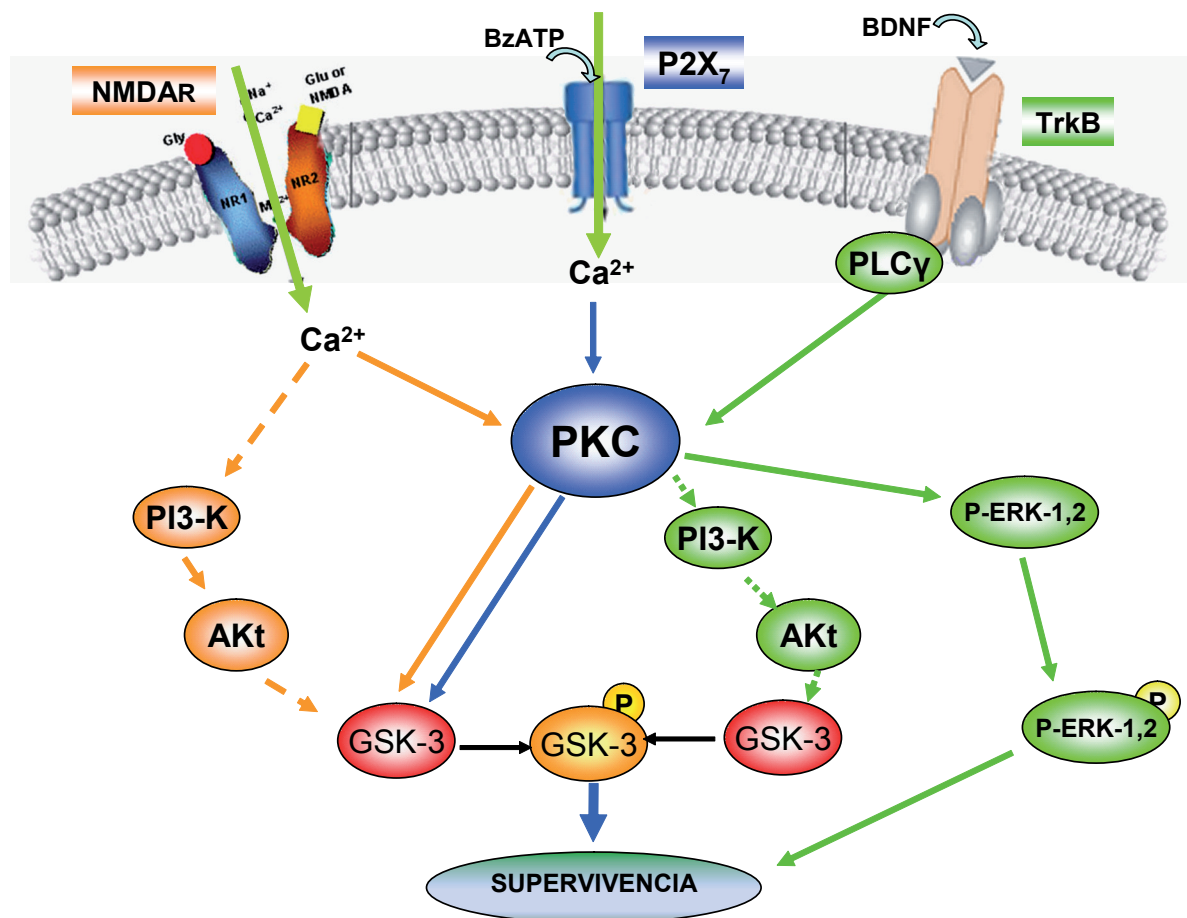


Figura 3.- Esquema resumen de la interacción del P2X7 con los receptores de BDNF y NMDA. El receptor P2X7 comparte con el receptor de NMDA la vía mediada por PKC hacia la fosforilación de GSK3, pudiendo llegar el receptor de NMDA, además, a esta quinasa por una vía dependiente de PI3K/Akt. El receptor de BDNF posee igualmente un punto de inicio común en PKC en su señalización, fosforilando por un lado a la GSK3 vía PI3K/Akt, mientras que por otro fosforila y activa a las ERK-1/2 que intervienen de forma crucial en la supervivencia.

La dependencia de las proteínas ERK1/2 en el efecto protector del BDNF explica que la potenciación entre el BzATP y BDNF se pueda observar también a concentraciones máximas para ambos factores, ya que ambos estarían disparando diferentes vías de señalización intracelulares, que los llevarían a actuar sobre distintas dianas para frenar la activación de la maquinaria apoptótica. Para el BDNF se ha descrito que puede actuar aumentando la expresión

de genes anti-apoptóticos de la familia bcl-2, o activando factores de transcripción como NFκB y CREB, de una manera dependiente de las MAPK (Jiang y cols., 2003b). Para el BzATP, una de las dianas podría ser la proteína pro-apoptótica Bax, que se ha descrito anteriormente, que puede ser fosforilada por la GSK3 en neuronas granulares (Linseman y cols., 2004).

Por último, es importante destacar que en neuronas granulares de cerebelo está bien descrito y caracterizado un mecanismo de reforzamiento de la neuroprotección en el que cooperan NMDA y BDNF, denominado “loop autocrino de BDNF” (Jiang y cols., 2003b). Muchas de las acciones protectoras del NMDA, así como su señalización hacia PI3K/Akt y ERK-1,2, dependen parcialmente de la activación de los receptores TrkB de BDNF (Zhu y cols., 2005; Bazan-Peregrino y cols., 2007). Se ha descrito que el NMDA induce la liberación de BDNF de las neuronas granulares, y es el BDNF al actuar sobre sus receptores TrkB en las mismas neuronas granulares, el que despliega toda su señalización hacia Akt y ERK, originando las acciones neuroprotectoras (Marini y cols., 1998). Se ha demostrado a tiempos más largos de estimulación con el NMDA, la inducción y activación del factor de transcripción NFκB, que sería responsable del aumento de la expresión del mRNA de BDNF y la síntesis de BDNF. Esto no quiere decir que el NMDA no tenga acciones propias, sino que además de éstas, se producen otras que están mediadas directamente por el BDNF (Zhu y cols., 2002; Marini y cols., 2004; Zhu y cols., 2005).

A este respecto hay que señalar que en las condiciones en las que se han desarrollado nuestros experimentos de viabilidad, no se favorecen efectos que sean debidos a la liberación de ciertos factores. De acuerdo con esto, los efectos protectores del BzATP no se veían afectados por la inhibición del receptor TrkB, y además se reproducían en cultivos de menor densidad (datos no mostrados). Estos datos nos permiten afirmar que los efectos protectores de estos tres factores, BzATP, NMDA y BDNF, se deben a que están actuando de manera específica sobre sus receptores y que están mediando acciones propias. Si bien no se puede descartar, que en condiciones más fisiológicas, o más “in vivo”, pueda tener lugar además el loop autocrino de NMDA-BDNF, en el que el BzATP podría intervenir o reforzar de alguna manera su actuación neuroprotectora. De acuerdo con esta posibilidad, en estudios previos realizados por nuestro grupo ya se había visto que el BzATP era capaz de inducir la liberación de glutamato en neuronas granulares (Leon y cols., 2008). El hecho de que el BzATP participe o no en este mecanismo con el BDNF está todavía por investigar y podría dar una nueva dimensión a las acciones protectoras de los nucleótidos.

2.- SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS ACOPLADA A LAS PROTEÍNAS ERK/1,2 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

Las proteínas ERK1 y ERK2, también conocidas como p44MAPK y p42MAPK, pertenecen a la familia de las MAPK (*mitogen activated protein kinase*), y están reguladas por fosforilaciones activadoras en treonina y tirosina, mientras que su inhibición se produce como consecuencia de la actividad de fosfatasa de las MAP quinasas (MKPs). La activación de estas quinasas la lleva a cabo la MAP quinasa quinasa 1/2 (MKK 1/2) que a su vez está activada por quinasas de la familia de Raf. La actividad de las ERK también depende de otros elementos como el AMPc, el calcio o la actividad de la PI3K. Estas quinasas intervienen en numerosos procesos relacionados con la proliferación y diferenciación celular, plasticidad neuronal, transformación neoplásica y supervivencia (Hetman y Gozdz, 2004) (Hetman y Xia, 2000) (Pearson y cols., 2001) (Adams y Sweatt, 2002).

En la presente Tesis Doctoral, se describe el acoplamiento de la señalización mediada tanto por el receptor de nucleótidos metabotrópico P2Y₁₃, como por el receptor ionotrópico P2X7, a la fosforilación y activación de las proteínas ERK1/2. El receptor P2Y₁₃ activa, entonces, dos vías de señalización paralelas e independientes en neuronas granulares, cuyo punto inicial común es la PI3K, activando por un lado a las ERK1/2 e inactivando, de forma dependiente de Akt, a la GSK3. En el caso del receptor P2X7, las proteínas ERK y GSK3 siguen igualmente señalizaciones independientes, inactivando a la GSK3 vía PKC y activando a las ERK por medio de una vía de señalización dependiente de CaMKII.

La señalización activada por los receptores de nucleótidos asociada a las proteínas ERK1/2 está ampliamente documentada en la bibliografía, tanto para receptores P2Y como P2X. Como ejemplo, los receptores P2Y₂, activados por UTP en células C6 de glioma, inducen la proliferación por activación de las ERK vía Ras/Raf (Tu y cols., 2000). En el mismo modelo celular, el receptor P2Y₁₂ activa, vía Gi y por una señalización dependiente de RhoA/PKC, a las proteínas ERK (Van Kolen y cols., 2006) (Van Kolen y Slegers, 2006). En las células HUVEC, el receptor P2Y₁, induce la migración de estas células en cultivo, a través de la fosforilación y activación de las ERK, JNK y p38, que a su vez, fosforilan a los factores de transcripción c-jun y factor de transcripción-2 (Shen y DiCorleto, 2008). Este mismo receptor es el responsable de la proliferación en fibroblastos, mediada por una activación paralela e independiente de las vías de la PI3K/Akt y de las ERK (Gerasimovskaya y cols., 2005), de forma semejante a la activación mediada por el P2Y₁₃ en las neuronas granulares de cerebelo. Por último, los P2Y colaboran también en las señales de supervivencia a través de la activación de las ERK, como se observa en la atenuación de la apoptosis inducida por el TNFα por medio de la activación

de estas proteínas mediada por el receptor $P2Y_{12}$ en astrocitos (Mamedova y cols., 2006), así como en la transactivación mediada por los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$ del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo que lleva a la fosforilación de las ERK en las células cromafines bovinas (Luke y Hexum, 2008).

Con respecto al receptor $P2Y_{13}$, su acoplamiento a la activación de las ERK ha sido descrito previamente en astrocitos de cerebelo, aunque en este caso dependía de las src-tirosina quinasas (Carrasquero y cols., 2005; Carrasquero L. M. G., 2006). En las células dendríticas, un receptor de ADP todavía no identificado, probablemente $P2Y_{12}$ o $P2Y_{13}$, está asociado igualmente a la fosforilación de estas quinasas (Marteau y cols., 2004). Por su parte, los receptores $P2X1$ activan a la proteínas ERK1/2 en las plaquetas por medio de una vía dependiente de calcio y de PKC (Oury y cols., 2002), mientras que el receptor $P2X2$ las activa en células PC12 a través de una vía de señalización dependiente de calcio y de Pyk2 (Swanson y cols., 1998). Por último, los receptores heteroméricos $P2X2/3$ colaboran en las fases iniciales de la inducción del dolor crónico en la médula espinal a través de la activación de estas quinasas (Nakagawa y cols., 2008). En cuanto al receptor $P2X7$ también existen numerosas referencias, como es el caso de las células de astrocitoma humano, donde el $P2X7$ fosforila y activa las ERK por un mecanismo dependiente de calcio, Pyk2/cSrc, PI3K y PKC γ (Gendron y cols., 2003). Asimismo, en astrocitos, el $P2X7$ activa ERK y p38 aumentando la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1, MCP1 y mediando respuestas inflamatorias (Panenka y cols., 2001), en células Jurkat media un efecto proliferativo a través de varias vías entre las que se incluyen las ERK1/2 (Budagian y cols., 2003), que se ha visto que se activan de forma independiente de calcio y dependiente del extremo N-terminal del receptor (Amstrup y Novak, 2003). En nuestro modelo, el receptor $P2X7$, por su parte, activaría las ERK a través de una vía de señalización dependiente de calcio y de la CaMKII, cuya implicación en la señalización mediada por este receptor en neuronas granulares de cerebelo ya había sido demostrado en trabajos anteriores de este grupo (Leon y cols., 2006; Leon y cols., 2008). En cuanto a la CaMKII, está acoplada a la fosforilación y activación de las MEK/ERK en células de adenocarcinoma de colon, lo que induce su proliferación (Li y cols., 2009). Igualmente interacciona con Raf, modulando la activación de las ERK mediada por integrinas en líneas celulares de hepatoma Hep3B y TADZ de tiroides (Illario y cols., 2003), y también está implicada en la regulación de los efectos mediados por las ERK en la señalización intracelular dopaminérgica y serotoninérgica en neuronas (Browning y cols., 2005).

La activación de las proteínas ERK1/2 parece tener un papel dual en las respuestas fisiológicas derivadas de su señalización intracelular, en lo que a supervivencia se refiere. Por una parte son muchos las investigaciones que apoyan las los importantes efectos antiapoptóticos mediados por estas quinasas, frente a la privación de factores tróficos, como es el caso de diversos factores, como el NGF, BDNF, AMPc, PACAP y forskolina, en distintos modelos neuronales (Xia y cols., 1995) (Meyer-Franke y cols., 1998) (Nakazawa y cols., 2002) (Bonni

y cols., 1999). En este mismo sentido, existen numerosos trabajos que indican que las ERK juegan un papel mucho más importante en la protección de las neuronas frente a elementos generadores de daño, como por ejemplo daño a nivel del DNA inducido por drogas como la camptotecina o la cisplatina, frente al cuál las ERK1/2 estarían mediando la protección ejercida por el BDNF en neuronas corticales (Hetman y cols., 1999) (Gozdz y cols., 2003). Las ERK1/2 también parecen tener un papel principal en el incremento de la supervivencia neuronal frente a modelos de hipoxia o isquemia, siendo las proteínas responsables de los efectos protectores mediados por el BDNF frente a al daño cerebral isquémico/hipóxico en ratas de 7 días de vida (Han y Holtzman, 2000).

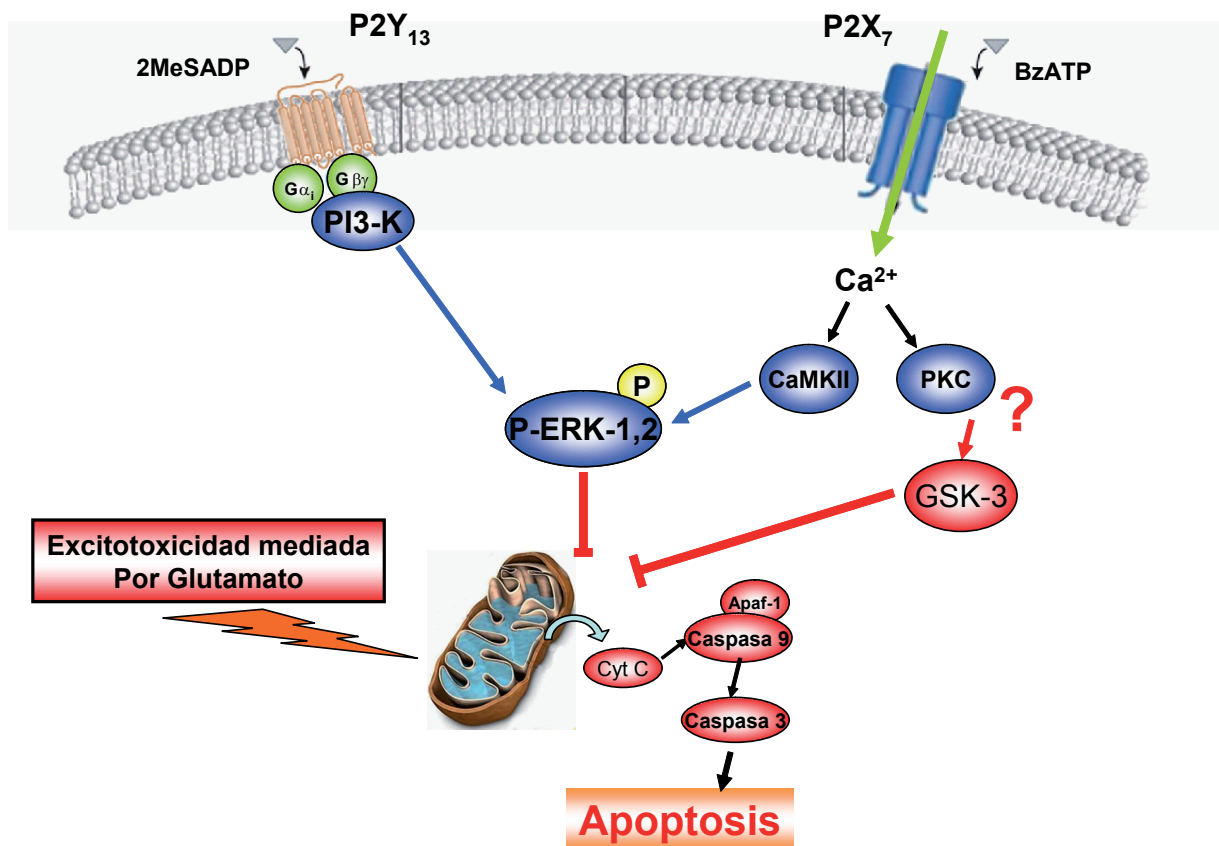


Figura 4.- Esquema resumen de la señalización mediada por nucleótidos hacia las ERK-1/2 en neuronas granulares de cerebelo. Tanto el receptor P2X₇ como el receptor P2Y₁₃ inducen la fosforilación y activación de las ERK-1/2. El primero por una vía dependiente de CaMKII mientras que el segundo por una vía dependiente de PI3K. La activación de las ERK-1/2 protege a las neuronas granulares frente a la excitotoxicidad mediada por glutamato. Esta protección esta enteramente mediada por las ERK-1/2 en el caso del P2Y₁₃, mientras que para el P2X₇ para estar involucrada una segunda vía, probablemente mediada por la GSK3.

Esto está de acuerdo con numerosos trabajos que relacionan a las ERK1/2 como las principales quinasas implicadas en la neuroprotección frente a la excitotoxicidad generada por glutamato, inducida por los estrógenos en neuronas corticales (Singer y cols., 1999), o por nicotina en neuronas hipocámpales (Ferchmin y cols., 2003). En nuestro trabajo se ha demostrado que las ERK1/2 son las responsables de los efectos protectores mediados por la activación de los receptores de nucleótidos, P2Y₁₃ y P2X₇, frente a la excitotoxicidad por

glutamato en neuronas granulares de cerebelo. Estos receptores rescataron a las células de la apoptosis y previnieron el incremento de los niveles del fragmento activo de caspasa-3 inducidos por dosis tóxicas de glutamato. Estos efectos protectores fueron totalmente dependientes de la actividad de las ERK1/2 en el caso del receptor $P2Y_{13}$. De manera similar se ha observado para los receptores de AMPA, que también protegen a las neuronas granulares de cerebelo de la excitotoxicidad mediada por glutamato por medio de la activación de la PI3K/Akt y las ERK, lo que resulta en el aumento de la expresión y liberación del BDNF, encargado de llevar a cabo los verdaderos efectos neuroprotectores (Wu y cols., 2004). En el caso del receptor $P2X_7$, en su efecto protector estaría implicada, además de las ERK1/2, otra vía, probablemente dependiente de la GSK3. De acuerdo con esto, se han descrito efectos neuroprotectores del litio frente a la excitotoxicidad mediada por glutamato en cultivos de neuronas granulares, y que solo fueron en parte explicados por su efecto inhibitor sobre la señalización mediada por los receptores de NMDA (Chen y cols., 2003). En otros trabajos, en cambio, la neuroprotección del litio frente al glutamato estuvo claramente asociada con la activación del eje PI3K/Akt, lo que también indujo la fosforilación e inhibición de la GSK3 (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999).

En la otra cara de la moneda, la activación permanente y persistente de las ERK1/2 inducida por determinados estímulos, como las bajas concentraciones de potasio en los cultivos de neuronas granulares de cerebelo, parece mediar la muerte neuronal por daño en la membrana plasmática y por condensación nuclear derivada de la translocación de las ERK al núcleo (Subramaniam y cols., 2004). El mismo tipo de muerte celular es inducida por las especies reactivas de oxígeno en astrocitos (Shinozaki y cols., 2006). La apoptosis en estos casos fue prevenida por la actuación de diversos factores tróficos como el factor GDF-15, o el IGF-I en neuronas granulares (Subramaniam y cols., 2003) (Subramaniam y cols., 2005), o por la activación del receptor $P2Y_1$ en el caso de los astrocitos (Shinozaki y cols., 2006; Fujita y cols., 2009). Todos estos factores protectores indujeron la activación temprana y transitoria de las ERK inhibiendo la fosforilación permanente.

3. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE LA SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS P2Y₁₃ Y P2X7 EN LAS NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

Los resultados presentados a lo largo de esta Tesis Doctoral van en el sentido de que los receptores de nucleótidos comparten señalización con los factores tróficos para promover la supervivencia celular en neuronas granulares de cerebelo, por medio de su acoplamiento a la inhibición de la GSK3 y a la activación de las proteínas ERK, disparando mecanismos neuroprotectores frente a distintos tipos de estímulos apoptóticos. Por lo tanto, los nucleótidos poseen la habilidad de contrarrestar las consecuencias tóxicas para las neuronas derivadas de la activación de la GSK3, para mantener la supervivencia en condiciones en las que principales rutas de supervivencia no están disponibles, como ocurre por ejemplo en condiciones de privación de los factores tróficos. A su vez, pueden constituir un importante refuerzo de las señalizaciones mediadas por estos factores neurotróficos, potenciando sus efectos beneficiosos para las neuronas en contra de la apoptosis.

Con respecto al papel de los nucleótidos en la muerte celular y la supervivencia, se han descrito tanto acciones protectoras como perjudiciales a nivel del sistema Nervioso Central (Volonte y cols., 2003) (Sperlagh y cols., 2006). De hecho, los nucleótidos han sido propuestos como sensores de daño, con funciones duales, liberándose para preparar al tejido y activar funciones fisiológicas normales o protectoras y de supervivencia contra el daño. Esto se ha descrito, por ejemplo para el receptor P2X4 en la recuperación del fallo isquémico cardíaco en ratones (Sonin y cols., 2008). De la misma manera, el P2X7 estimula los astrocitos para incrementar la producción de factores tróficos, e interviene en la respuesta al daño cerebral incrementando la supervivencia (Silberstein y cols., 1996) (Hung y cols., 2005), al igual que participa en la recuperación frente a la isquemia cerebral en rata (Yanagisawa y cols., 2008). En este mismo sentido, la activación de la PI3K/Akt por receptores P2Y₁ parece tener un carácter antiapoptótico frente a la generación de daño tisular en el tejido nervioso (Franke H, 2008).

Asimismo, muchas de las funciones protectoras de los receptores de nucleótidos tienen que ver con su cooperación con factores tróficos, sobre todo para los receptores P2Y, bien por interacción a nivel de las vías de señalización, como a través de mecanismos de transactivación. Como por ejemplo lo descrito para el receptor P2Y₂, que potencia el efecto en la diferenciación neuronal, el crecimiento de neuritas y la supervivencia, mediados por el factor de crecimiento NGF a través de la vía de señalización mediada por TrkA/ERK1/2/Akt en células PC12 y neuronas DRG (Arthur y cols., 2006b) (Arthur y cols., 2005). Igualmente el receptor P2Y₁ potencia la proliferación mediada por los factores de crecimiento que resulta vital en la neurogénesis adulta y embrionaria (Mishra y cols., 2006) (Moore y cols., 2002). En cambio, no

existen muchos ejemplos de efectos potenciadores para los receptores P2X, siendo lo descrito en esta Tesis una novedad para el P2X7. Si bien sí se han descrito interacciones entre distintos receptores ionotrópicos.

Sin embargo, y en la otra cara de la señalización mediante nucleótidos, una estimulación continuada e intensa tras el daño celular puede producir la amplificación del daño y la toxicidad, como se observa en el incremento de daño e inflamación mediada por el P2X7 en los oligodendrocitos de la materia blanca (Choi y cols., 2007) (Matute, 2008). Otro buen ejemplo de esta dualidad lo encontramos en las células ganglionares sanas de retina, donde en condiciones normales el P2X7 está implicado en las funciones visuales normales siendo su contribución beneficiosa, mientras que en situaciones desequilibradas donde los niveles de ATP extracelulares son muy elevados, como en el caso del glaucoma, la estimulación continuada del P2X7 puede dañar las células ganglionares (Mitchell y cols., 2008).

Un buen punto de partida para profundizar de los mecanismos disparados por los receptores P2Y₁₃ y P2X7 en las neuronas granulares lo tenemos en los resultados obtenidos de los estudios de microarrays. Los estudios llevados a cabo sobre los diferentes procesos biológicos o moleculares asociados a grupos de genes en las neuronas granulares de cerebelo parecen confirmar la tendencia expresada a lo largo de toda esta Tesis Doctoral sobre la predisposición de la señalización mediada por nucleótidos a la activación de elementos mediadores de supervivencia para la célula. En ellos se ve que existe una coincidencia en las funciones activadas por ambos receptores nucleotídicos, en el sentido que los grupos de genes que se encuentran sobreexpresados de manera más significativa están relacionados con la supervivencia, y procesos de reparación y regeneración, concretamente procesos relacionados con la respuesta al daño del DNA, a la radiación, a la interacción con los factores tróficos, etc. La ingente cantidad de información generada tras los estudios de expresión mediante *microarrays* necesita ser estudiada en profundidad. Serán necesarios experimentos que confirmen la dirección y el significado de los procesos controlados por los nucleótidos de un modo más directo.

La conclusión general es que la señalización activada por los nucleótidos en las neuronas granulares de cerebelo puede constituir un elemento de defensa muy importante para la célula frente situaciones de estrés o que comprometan su supervivencia. La señalización mediada por nucleótidos en situaciones patológicas o enfermedades neurodegenerativas y su posible actuación como receptores diana para restaurar la situación fisiológica, es una posibilidad de la que queda constancia en esta tesis, al demostrar el control que ejercen los receptores P2Y₁₃ y P2X7 sobre la GSK3 y las ERK en las neuronas granulares de cerebelo.

CONCLUSIONES

1.- Las neuronas granulares de cerebelo expresan receptores nucleotídicos P2Y y P2X, de entre los que destacan especialmente los receptores purinérgicos P2Y₁₃ y P2X7.

2.- La señalización de los receptores P2Y₁₃ y P2X7 está acoplada a las proteínas GSK3 y ERK1/2 en neuronas granulares de cerebelo.

- El receptor P2Y₁₃, y no el receptor P2Y₁ o P2Y₁₂, fosforila e inhibe la GSK3 a través de una vía dependiente de PI3K/Akt, permitiendo la estabilización y translocación al núcleo del regulador transcripcional β -catenina, implicada en procesos de supervivencia y diferenciación.

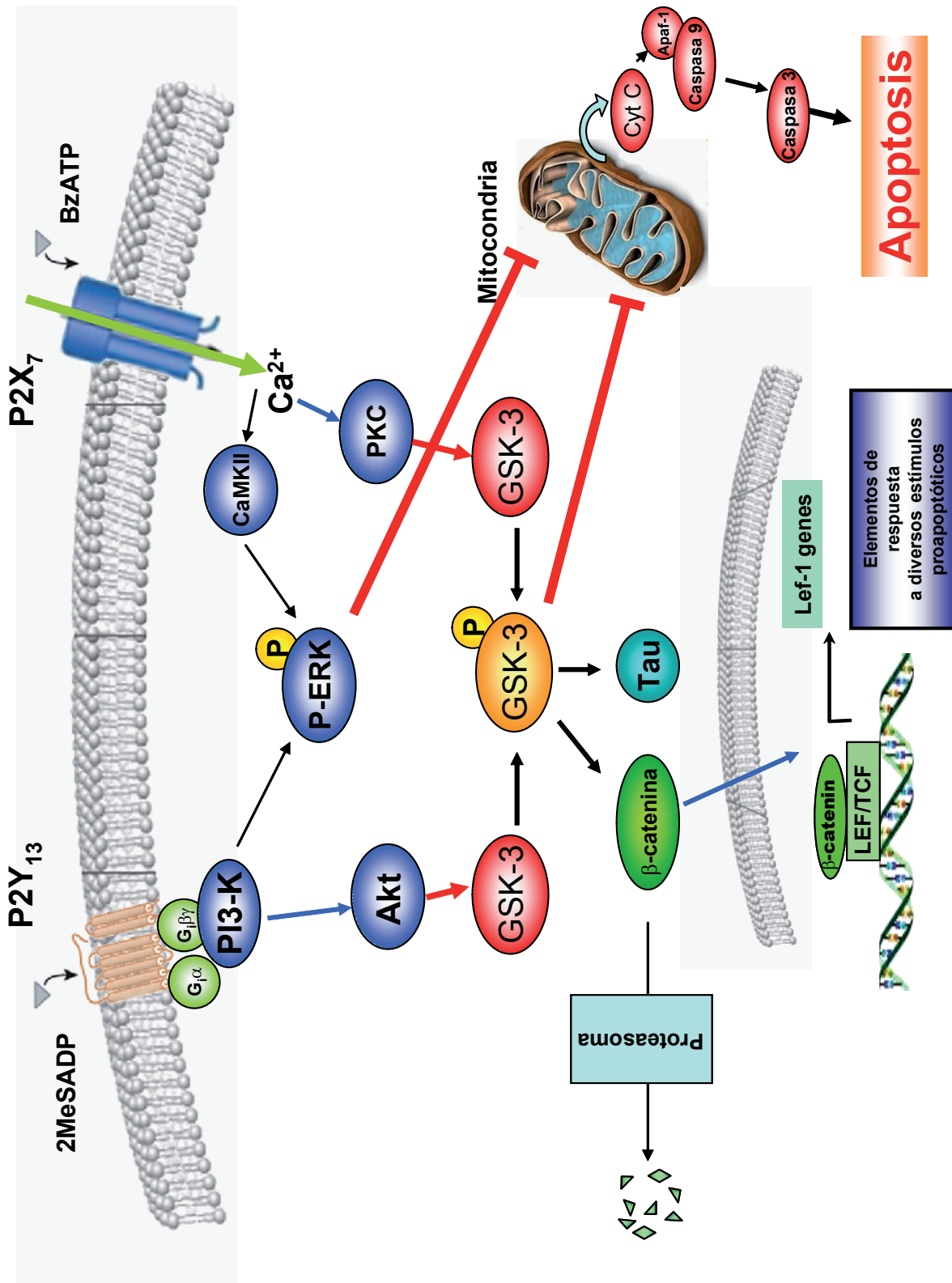
- El receptor P2X7 fosforila e inhibe a la proteína GSK3 a través de una vía dependiente de PKC, siendo éste el mecanismo responsable mediante el cuál el receptor P2X7 protege frente a la muerte provocada por la inhibición farmacológica de la PI3K.

- Ambos receptores nucleotídicos están acoplados a la fosforilación y activación las ERK1/2 empleando vías diferentes, el P2Y₁₃ a través de la PI3K y el P2X7, vía CaMKII. La señalización hacia ERK1/2 media el efecto neuroprotector observado tras la activación de los receptores P2Y₁₃ y P2X7 frente a la excitotoxicidad activada por glutamato.

3.- El receptor P2X7 media un efecto sinérgico con los receptores de BDNF y de NMDA, en la supervivencia neuronal frente a la apoptosis inducida por la inhibición de la PI3K. La interacción entre los receptores P2X7 y NMDA se produce a nivel de la señalización de calcio y de la fosforilación de la GSK3.

4.- La señalización mediada por los receptores P2Y₁₃ y P2X7 produce, en último término, el incremento de la expresión de determinados genes o grupos génicos que están implicados en la respuesta frente a ciertos estímulos perjudiciales para las neuronas, así como en la diferenciación y viabilidad neuronal.

Conclusiones



1.- Cerebellar granule neurons express P2Y and P2X purinergic receptors, among them P2Y₁₃ and P2X7 are specially relevant.

2.- P2Y₁₃ and P2X7 mediated signalling is coupled to GSK3 and ERK1/2 in cerebellar granule neurons.

- P2Y₁₃ receptor, not P2Y₁ or P2Y₁₂ receptors, phosphorylates and inhibits the catalytic activity of the GSK3, through a PI3K/Akt dependent pathway, allowing the transcriptional regulator, β -catenin, to get stabilized and to be translocated inside the nucleus. β -catenin activity is involved in survival and differentiation.

- P2X7 receptor phosphorylates and inhibits the GSK3 catalytic activity, through a PKC dependent pathway. This is the mechanism involved in the P2X7 mediated neuroprotection against the apoptosis induced by PI3K pharmacological inhibition.

- Both nucleotidic receptors are coupled to the phosphorylation and activation of ERK1/2 through two different pathways, P2Y₁₃ through PI3K and P2X7 through CaMKII. The ERK1/2 dependent pathway mediates the neuroprotective effect activated by the P2Y₁₃ and P2X7, against the glutamate-induced excitotoxicity.

3.-P2X7 shows a synergistic effect with BDNF and NMDA receptors in the neuroprotection against apoptosis induced by PI3K pharmacological inhibition. The interaction between P2X7 and NMDA receptors occurs at calcium and GSK3 signalling levels.

4.- P2X7 and P2Y₁₃ receptors mediated signalling increase the transcription of certain genes or genetic groups which are involved in the response against several proapoptotic stimuli in the cerebellar granule neurons as well as in the differentiation and neuronal survival processes.

BIBLIOGRAFÍA



- Abbott N. J. (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cellular and molecular neurobiology* 20, 131-147.
- Abbraccio M. P. and Burnstock G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics* 64, 445-475.
- Abbraccio M. P. and Burnstock G. (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese journal of pharmacology* 78, 113-145.
- Abbraccio M. P., Boeynaems J. M., Barnard E. A., Boyer J. L., Kennedy C., Miras-Portugal M. T., King B. F., Gachet C., Jacobson K. A., Weisman G. A. and Burnstock G. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences* 24, 52-55.
- Abbraccio M. P., Burnstock G., Boeynaems J. M., Barnard E. A., Boyer J. L., Kennedy C., Knight G. E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K. A. and Weisman G. A. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* 58, 281-341.
- Adams J. P. and Sweatt J. D. (2002) Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42, 135-163.
- Al-Shahrour F., Carbonell J., Minguez P., Goetz S., Conesa A., Tarraga J., Medina I., Alloza E., Montaner D. and Dopazo J. (2008) Babelomics: advanced functional profiling of transcriptomics, proteomics and genomics experiments. *Nucleic acids research* 36, W341-346.
- Alekseeva N., Kablinger A. S., Pinkston J., Gonzalez-Toledo E. C. and Minagar A. (2005) Hereditary ataxia and behavior. *Advances in neurology* 96, 275-283.
- Alessi D. R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P. and Hemmings B. A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 15, 6541-6551.
- Algaier I., Jakubowski J. A., Asai F. and von Kugelgen I. (2008) Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y₁₂ receptor. *J Thromb Haemost* 6, 1908-1914.
- Alvarez G., Munoz-Montano J. R., Satrustegui J., Avila J., Bogonez E. and Diaz-Nido J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS letters* 453, 260-264.
- Alzola E., Perez-Etxebarria A., Kabre E., Fogarty D. J., Metioui M., Chaib N., Macarulla J. M., Matute C., Dehay J. P. and Marino A. (1998) Activation by P2X₇ agonists of two phospholipases A₂ (PLA₂) in ductal cells of rat submandibular gland. Coupling of the calcium-independent PLA₂ with kallikrein secretion. *The Journal of biological chemistry* 273, 30208-30217.
- Allen G., McColl R., Barnard H., Ringe W. K., Fleckenstein J. and Cullum C. M. (2005) Magnetic resonance imaging of cerebellar-prefrontal and cerebellar-parietal functional connectivity. *NeuroImage* 28, 39-48.
- Alloisio S., Cugnoli C., Ferroni S. and Nobile M. (2004) Differential modulation of ATP-induced calcium signalling by A₁ and A₂ adenosine receptors in cultured cortical astrocytes. *British journal of pharmacology* 141, 935-942.
- Alloisio S., Cervetto C., Passalacqua M., Barbieri R., Maura G., Nobile M. and Marcoli M. (2008) Functional evidence for presynaptic P2X₇ receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals. *FEBS letters* 582, 3948-3953.
- Amari L., Layden B., Rong Q., Gerald C. F. and Mota de Freitas D. (1999) Comparison of fluorescence, (31)P NMR, and (7)Li NMR spectroscopic methods for investigating Li(+)/Mg(2+) competition for biomolecules. *Analytical biochemistry* 272, 1-7.
- Amit S., Hatzubai A., Birman Y., Andersen J. S., Ben-Shushan E., Mann M., Ben-Neriah Y. and Alkalay I. (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & development* 16, 1066-1076.
- Amstrup J. and Novak I. (2003) P2X₇ receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *The Biochemical journal* 374, 51-61.
- Anderson C. M. and Nedergaard M. (2006) Emerging challenges of assigning P2X₇ receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends in neurosciences* 29, 257-262.
- Angiolillo D. J., Bates E. R. and Bass T. A. (2008) Clinical profile of prasugrel, a novel thienopyridine. *American heart journal* 156, S16-22.
- Apionishev S., Katanayeva N. M., Marks S. A., Kalderon D. and Tomlinson A. (2005) Drosophila Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nature cell biology* 7, 86-92.
- Aplin A. E., Jacobsen J. S., Anderton B. H. and Gallo J. M. (1997) Effect of increased glycogen synthase kinase-3 activity upon the maturation of the amyloid precursor protein in transfected cells. *Neuroreport* 8, 639-643.
- Armstrong J. N., Brust T. B., Lewis R. G. and MacVicar B. A. (2002) Activation of presynaptic P2X₇-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 22, 5938-5945.
- Armstrong J. S. (2006) Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 28, 253-260.
- Armstrong S., Pereverzev A., Dixon S. J. and Sims

- S. M. (2009) Activation of P2X7 receptors causes isoform-specific translocation of protein kinase C in osteoclasts. *Journal of cell science* 122, 136-144.
- Arthur D. B., Akassoglou K. and Insel P. A. (2005) P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 19138-19143.
- Arthur D. B., Akassoglou K. and Insel P. A. (2006a) P2Y2 and TrkA receptors interact with Src family kinase for neuronal differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 347, 678-682.
- Arthur D. B., Georgi S., Akassoglou K. and Insel P. A. (2006b) Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J Neurosci* 26, 3798-3804.
- Aschrafi A., Sadtler S., Niculescu C., Rettinger J. and Schmalzing G. (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *Journal of molecular biology* 342, 333-343.
- Ase A. R., Raouf R., Belanger D., Hamel E. and Seguela P. (2005) Potentiation of P2X1 ATP-gated currents by 5-hydroxytryptamine 2A receptors involves diacylglycerol-dependent kinases and intracellular calcium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 144-154.
- Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M. and Sherlock G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* 25, 25-29.
- Ashkenazi A. and Dixit V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y)* 281, 1305-1308.
- Athias M. (1897) Recherches sur l'histogénèse de l'écorce du cerveau. *J. Anat. Physiol* 33, 372-404.
- Atkinson L., Milligan C. J., Buckley N. J. and Deuchars J. (2002) An ATP-gated ion channel at the cell nucleus. *Nature* 420, 42.
- Atkinson L., Batten T. F., Moores T. S., Varoqui H., Erickson J. D. and Deuchars J. (2004) Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience* 123, 761-768.
- Avila J., Lucas J. J., Perez M. and Hernandez F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological reviews* 84, 361-384.
- Ayyanathan K., Webb T. E., Sandhu A. K., Athwal R. S., Barnard E. A. and Kunapuli S. P. (1996) Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor. *Biochemical and biophysical research communications* 218, 783-788.
- Bahima L., Aleu J., Elias M., Martin-Satue M., Muhaisen A., Blasi J., Marsal J. and Solsona C. (2006) Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes. *Journal of cellular physiology* 206, 95-102.
- Bailey M. A. and Shirley D. G. (2009) Effects of extracellular nucleotides on renal tubular solute transport. *Purinergic signalling*.
- Bailey M. A., Imbert-Teboul M., Turner C., Marsy S., Strai K., Burnstock G. and Unwin R. J. (2000) Axial distribution and characterization of basolateral P2Y receptors along the rat renal tubule. *Kidney international* 58, 1893-1901.
- Balazs R., Gallo V. and Kingsbury A. (1988) Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res* 468, 269-276.
- Balogh J., Wihlborg A. K., Isackson H., Joshi B. V., Jacobson K. A., Arner A. and Erlinge D. (2005) Phospholipase C and cAMP-dependent positive inotropic effects of ATP in mouse cardiomyocytes via P2Y11-like receptors. *Journal of molecular and cellular cardiology* 39, 223-230.
- Bar I., Guns P. J., Metallo J., Cammarata D., Wilkin F., Boeynants J. M., Bult H. and Robaye B. (2008) Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology* 74, 777-784.
- Barajas-Lopez C., Montano L. M. and Espinosa-Luna R. (2002) Inhibitory interactions between 5-HT3 and P2X channels in submucosal neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G1238-1248.
- Bardoni R., Goldstein P. A., Lee C. J., Gu J. G. and MacDermott A. B. (1997) ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 17, 5297-5304.
- Barrera N. P., Henderson R. M., Murrell-Lagnado R. D. and Edwardson J. M. (2007) The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophysical journal* 93, 505-512.
- Barrera N. P., Ormond S. J., Henderson R. M., Murrell-Lagnado R. D. and Edwardson J. M. (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *The Journal of biological chemistry* 280, 10759-10765.
- Bazan-Peregrino M., Gutierrez-Kobeh L. and Moran J. (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in the protective action of N-methyl-D-aspartate in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by low potassium. *Journal of neuroscience research* 85, 332-341.
- Beaulieu J. M., Sotnikova T. D., Yao W. D., Kockeritz L., Woodgett J. R., Gainetdinov R. R. and Caron M. G. (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5099-5104.
- Belmaker R. H. (2004) Bipolar disorder. *The New England journal of medicine* 351, 476-486.
- Benjamin W. B., Pentyala S. N., Woodgett J. R., Hod Y. and Marshak D. (1994) ATP citrate-lyase and glycogen synthase kinase-3 beta in 3T3-L1 cells during differentiation into adipocytes. *The Biochemical journal* 300 (Pt 2), 477-482.
- Bennecib M., Gong C. X., Grundke-Iqbal I. and Iqbal K. (2000) Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS letters* 485, 87-93.
- Berenbaum F., Humbert L., Bereziat G. and Thirion S. (2003) Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes. *The Journal of biological chemistry* 278, 13680-13687.
- Beurel E. and Jope R. S. (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in neurobiology* 79, 173-189.
- Beurel E., Kornprobst M., Blivet-Van Eggelpoel M. J., Ruiz-Ruiz C., Cadoret A., Capeau J. and Desbois-Mouthon C. (2004) GSK-3beta inhibition by lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression. *Experimental cell research* 300, 354-364.
- Beyaert R., Vanhaesebroeck B., Suffys P., Van Roy F. and Fiers W. (1989) Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9494-9498.
- Bezzi P., Domercq M., Vesce S. and Volterra A. (2001) Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications. *Progress in brain research* 132, 255-265.
- Bhanot P., Brink M., Samos C. H., Hsieh J. C., Wang Y., Macke J. P., Andrew D., Nathans J. and Nusse R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-230.
- Bhat R., Xue Y., Berg S., Hellberg S., Ormo M., Nilsson Y., Radesater A. C., Jerning E., Markgren P. O., Borgegard T., Nylof M., Gimenez-Cassina A., Hernandez F., Lucas J. J., Diaz-Nido J. and Avila J. (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *The Journal of biological chemistry* 278, 45937-45945.
- Bhat R. V., Budd Haeberlein S. L. and Avila J. (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *Journal of neurochemistry* 89, 1313-1317.
- Bhat R. V., Shanley J., Correll M. P., Fieles W. E., Keith R. A., Scott C. W. and Lee C. M. (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11074-11079.
- Bhave S. V., Ghoda L. and Hoffman P. L. (1999) Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci* 19, 3277-3286.
- Bian X., Ren J., DeVries M., Schnegelsberg B., Cockayne D. A., Ford A. P. and Galligan J. J. (2003) Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *The Journal of physiology* 551, 309-322.
- Bianchi B. R., Lynch K. J., Touma E., Niforatos W., Burgard E. C., Alexander K. M., Park H. S., Yu H., Metzger R., Kowaluk E., Jarvis M. F. and van Biesen T. (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *European journal of pharmacology* 376, 127-138.
- Bierend A., Rau T., Maas R., Schwedhelm E. and Boger R. H. (2008) P2Y12 polymorphisms and antiplatelet effects of aspirin in patients with coronary artery disease. *British journal of clinical pharmacology* 65, 540-547.
- Bijur G. N., De Sarno P. and Jope R. S. (2000) Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *The Journal of biological chemistry* 275, 7583-7590.
- Blair A. S., Hajdich E., Litherland G. J. and Hundal H. S. (1999) Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 274, 36293-36299.
- Blaschko H., Born G. V., D'Iorio A. and Eade N. R. (1956) Observations on the distribution of catechol amines and adenosinetriphosphate in the bovine adrenal medulla. *The Journal of physiology* 133, 548-557.
- Bo X., Jiang L. H., Wilson H. L., Kim M., Burnstock G., Surprenant A. and North R. A. (2003) Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Molecular pharmacology* 63, 1407-1416.
- Bobanovic L. K., Royle S. J. and Murrell-Lagnado R. D. (2002) P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci* 22, 4814-4824.
- Bodin P. and Burnstock G. (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical research* 26, 959-969.
- Boeck C. R., Kroth E. H., Bronzatto M. J. and Vendite D. (2005) Adenosine receptors co-operate with

- NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology* 49, 17-24.
- Boeynaems J. M., van Giezen H., Savi P. and Herbert J. M. (2005) P2Y receptor antagonists in thrombosis. *Curr Opin Investig Drugs* 6, 275-282.
- Bogdanov Y. D., Dale L., King B. F., Whittock N. and Burnstock G. (1997) Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *The Journal of biological chemistry* 272, 12583-12590.
- Boissan M., Beurel E., Wendum D., Rey C., Lecluse Y., Housset C., Lacombe M. L. and Desbois-Mouthon C. (2005) Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *The American journal of pathology* 167, 869-877.
- Bolego C., Pinna C., Abbracchio M. P., Cattabeni F. and Puglisi L. (1995) The biphasic response of rat vesical smooth muscle to ATP. *British journal of pharmacology* 114, 1557-1562.
- Bolstad B. M., Irizarry R. A., Astrand M. and Speed T. P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics (Oxford, England)* 19, 185-193.
- Bonni A., Brunet A., West A. E., Datta S. R., Takasu M. A. and Greenberg M. E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science (New York, N.Y)* 286, 1358-1362.
- Botia B., Basille M., Allais A., Raoult E., Falluel-Morel A., Galas L., Jolivel V., Wurtz O., Komuro H., Fournier A., Vaudry H., Burel D., Gonzalez B. J. and Vaudry D. (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28, 1746-1752.
- Boue-Grabot E., Archambault V. and Seguela P. (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *The Journal of biological chemistry* 275, 10190-10195.
- Boue-Grabot E., Emerit M. B., Toulme E., Seguela P. and Garret M. (2004) Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels. *The Journal of biological chemistry* 279, 6967-6975.
- Bowler J. W., Bailey R. J., North R. A. and Surprenant A. (2003) P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages. *British journal of pharmacology* 140, 567-575.
- Boyer J. L., Mohanram A., Camaioni E., Jacobson K. A. and Harden T. K. (1998) Competitive and selective antagonism of P2Y1 receptors by N6-methyl 2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate. *British journal of pharmacology* 124, 1-3.
- Boyer J. L., Adams M., Ravi R. G., Jacobson K. A. and Harden T. K. (2002) 2-Chloro N(6)-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y(1) receptor antagonist. *British journal of pharmacology* 135, 2004-2010.
- Bradford M. D. and Soltoff S. P. (2002) P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *The Biochemical journal* 366, 745-755.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brajenovic M., Joberty G., Kuster B., Bouwmeester T. and Drewes G. (2004) Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network. *The Journal of biological chemistry* 279, 12804-12811.
- Brake A. J., Wagenbach M. J. and Julius D. (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371, 519-523.
- Brambilla R., Neary J. T., Cattabeni F., Cottini L., D'Ippolito G., Schiller P. C. and Abbracchio M. P. (2002) Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *Journal of neurochemistry* 83, 1285-1296.
- Braun K., Rettinger J., Ganso M., Kassack M., Hildebrandt C., Ullmann H., Nickel P., Schmalzing G. and Lambrecht G. (2001) NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 364, 285-290.
- Brinson A. E. and Harden T. K. (2001) Differential regulation of the uridine nucleotide-activated P2Y4 and P2Y6 receptors. SER-333 and SER-334 in the carboxyl terminus are involved in agonist-dependent phosphorylation desensitization and internalization of the P2Y4 receptor. *The Journal of biological chemistry* 276, 11939-11948.
- Brough D., Le Feuvre R. A., Wheeler R. D., Solovyova N., Hilfiker S., Rothwell N. J. and Verkhatsky A. (2003) Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages. *J Immunol* 170, 3029-3036.
- Brown D. A., Filippov A. K. and Barnard E. A. (2000) Inhibition of potassium and calcium currents in neurones by molecularly-defined P2Y receptors. *Journal of the autonomic nervous system* 81, 31-36.
- Brown S. G., Townsend-Nicholson A., Jacobson K. A., Burnstock G. and King B. F. (2002) Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300, 673-680.
- Browning J. L., Patel T., Brandt P. C., Young K. A.,

- Holcomb L. A. and Hicks P. B. (2005) Clozapine and the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: implications for antipsychotic actions. *Biological psychiatry* 57, 617-623.
- Budagian V., Bulanov E., Brovko L., Orinska Z., Fayad R., Paus R. and Bulfone-Paus S. (2003) Signaling through P2X7 receptor in human T cells involves p56lck, MAP kinases, and transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* 278, 1549-1560.
- Buell G., Lewis C., Collo G., North R. A. and Surprenant A. (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *The EMBO journal* 15, 55-62.
- Buettner R., Papoutsoglou G., Scemes E., Spray D. C. and Dermietzel R. (2000) Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3201-3206.
- Buisson H. P., Steinberg T. H., Fischbarg J., Silverstein S. C., Vogelzang S. A., Ince C., Ypey D. L. and Leijh P. C. (1988) Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7988-7992.
- Burnstock G. (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*. Ed. Straub, R.W. y Bolis, L. Raven Press, Nueva York, 107-118.
- Burnstock G. (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36, 1127-1139.
- Burnstock G. (2002) Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clinical medicine (London, England)* 2, 45-53.
- Burnstock G. (2004) Introduction: P2 receptors. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 793-803.
- Burnstock G. (2005) Purinergic signalling: therapeutic potential. *An. R. Acad. Nac. Farm* 71, 283-319.
- Burnstock G. (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in pharmacological sciences* 27, 166-176.
- Burnstock G. (2007a) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64, 1471-1483.
- Burnstock G. (2007b) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews* 87, 659-797.
- Burnstock G. and Kennedy C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor? *General pharmacology* 16, 433-440.
- Burnstock G. and Knight G. E. (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International review of cytology* 240, 31-304.
- Burnstock G., Dumsday B. and Smythe A. (1972) Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *British journal of pharmacology* 44, 451-461.
- Burnstock G., Campbell G., Satchell D. and Smythe A. (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British journal of pharmacology* 40, 668-688.
- Cabrini G., Falzoni S., Forchap S. L., Pellegatti P., Balboni A., Agostini P., Cuneo A., Castoldi G., Baricordi O. R. and Di Virgilio F. (2005) A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol* 175, 82-89.
- Calvert J. A. and Evans R. J. (2004) Heterogeneity of P2X receptors in sympathetic neurons: contribution of neuronal P2X1 receptors revealed using knockout mice. *Molecular pharmacology* 65, 139-148.
- Cardona-Gomez P., Perez M., Avila J., Garcia-Segura L. M. and Wandosell F. (2004) Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Molecular and cellular neurosciences* 25, 363-373.
- Carrasquero L. M. G. D. E. G., Miras-Portugal M.T. (2006) Which is the receptor mediating ADP signaling in rat cerebellar astrocytes. *Purinergic signalling* 2.
- Carrasquero L. M., Delicado E. G., Jimenez A. I., Perez-Sen R. and Miras-Portugal M. T. (2005) Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors. *Purinergic signalling* 1, 153-159.
- Castellone M. D., Teramoto H., Williams B. O., Druey K. M. and Gutkind J. S. (2005) Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science (New York, N.Y)* 310, 1504-1510.
- Castro E., Tome A. R., Miras-Portugal M. T. and Rosario L. M. (1994) Single-cell fura-2 microfluorometry reveals different purinoreceptor subtypes coupled to Ca2+ influx and intracellular Ca2+ release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells. *Pflugers Arch* 426, 524-533.
- Cattaneo M. (2006) Disorders of platelet function. Abnormalities of the platelet P2 receptors. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 35, 10-14.
- Cattaneo M. (2007) Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert review of cardiovascular therapy* 5, 45-55.
- Cavaliere F., Amadio S., Angelini D. F., Sancesario G., Bernardi G. and Volonte C. (2004) Role of the metabotropic P2Y(4) receptor during hypoglycemia: cross talk with the ionotropic NMDAR1 receptor. *Experimental cell research* 300, 149-158.
- Cavaliere F., Nestola V., Amadio S., D'Ambrosi N., Angelini D. F., Sancesario G., Bernardi G. and

- Volonte C. (2005) The metabotropic P2Y4 receptor participates in the commitment to differentiation and cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurobiology of disease* 18, 100-109.
- Ciana P., Fumagalli M., Trincavelli M. L., Verderio C., Rosa P., Lecca D., Ferrario S., Parravicini C., Capra V., Gelosa P., Guerrini U., Belcredito S., Cimino M., Sironi L., Tremoli E., Rovati G. E., Martini C. and Abbracchio M. P. (2006) The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *The EMBO journal* 25, 4615-4627.
- Clarke C. E., Benham C. D., Bridges A., George A. R. and Meadows H. J. (2000) Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *The Journal of physiology* 523 Pt 3, 697-703.
- Clodfelder-Miller B., De Sarno P., Zmijewska A. A., Song L. and Jope R. S. (2005) Physiological and pathological changes in glucose regulate brain Akt and glycogen synthase kinase-3. *The Journal of biological chemistry* 280, 39723-39731.
- Clyne J. D., LaPointe L. D. and Hume R. I. (2002a) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *The Journal of physiology* 539, 347-359.
- Clyne J. D., Wang L. F. and Hume R. I. (2002b) Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci* 22, 3873-3880.
- Cockayne D. A., Hamilton S. G., Zhu Q. M., Dunn P. M., Zhong Y., Novakovic S., Malmberg A. B., Cain G., Berson A., Kassotakis L., Hedley L., Lachnit W. G., Burnstock G., McMahon S. B. and Ford A. P. (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407, 1011-1015.
- Coddou C., Morales B., Gonzalez J., Grauso M., Gordillo F., Bull P., Rassendren F. and Huidobro-Toro J. P. (2003) Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X4 nucleotide receptor by copper but not zinc. *The Journal of biological chemistry* 278, 36777-36785.
- Cohen M. M., Jr. (2003) The hedgehog signaling network. *American journal of medical genetics* 123A, 5-28.
- Cohen P., Nimmo H. G. and Proud C. G. (1978) How does insulin stimulate glycogen synthesis? *Biochemical Society symposium*, 69-95.
- Cole A., Frame S. and Cohen P. (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *The Biochemical journal* 377, 249-255.
- Collingridge G. L., Olsen R., Peters J. A. and Spedding M. (2009) Editorial. *Neuropharmacology* 56, 1.
- Collo G., Neidhart S., Kawashima E., Kosco-Vilbois M., North R. A. and Buell G. (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36, 1277-1283.
- Collo G., North R. A., Kawashima E., Merlo-Pich E., Neidhart S., Surprenant A. and Buell G. (1996) Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 16, 2495-2507.
- Communi D., Parmentier M. and Boeynaems J. M. (1996a) Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 222, 303-308.
- Communi D., Robaye B. and Boeynaems J. M. (1999) Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *British journal of pharmacology* 128, 1199-1206.
- Communi D., Piroton S., Parmentier M. and Boeynaems J. M. (1995) Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *The Journal of biological chemistry* 270, 30849-30852.
- Communi D., Motte S., Boeynaems J. M. and Piroton S. (1996b) Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *European journal of pharmacology* 317, 383-389.
- Communi D., Govaerts C., Parmentier M. and Boeynaems J. M. (1997) Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* 272, 31969-31973.
- Communi D., Gonzalez N. S., Detheux M., Brezillon S., Lannoy V., Parmentier M. and Boeynaems J. M. (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *The Journal of biological chemistry* 276, 41479-41485.
- Contestabile A. (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum (London, England)* 1, 41-55.
- Cook D., Fry M. J., Hughes K., Sumathipala R., Woodgett J. R. and Dale T. C. (1996) Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *The EMBO journal* 15, 4526-4536.
- Costanzi S., Mamedova L., Gao Z. G. and Jacobson K. A. (2004) Architecture of P2Y nucleotide receptors: structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling. *Journal of medicinal chemistry* 47, 5393-5404.
- Cotter D., Kerwin R., al-Sarraj S., Brion J. P., Chadwich A., Lovestone S., Anderton B. and Everall I. (1998) Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia-evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport* 9, 1379-1383.
- Coutinho-Silva R., Ojcius D. M., Gorecki D. C., Persechini P. M., Bisaggio R. C., Mendes A. N., Marks J., Burnstock G. and Dunn P. M. (2005) Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in

- mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. *Biochemical pharmacology* 69, 641-655.
- Coyle-Rink J., Del Valle L., Sweet T., Khalili K. and Amini S. (2002) Developmental expression of Wnt signaling factors in mouse brain. *Cancer biology & therapy* 1, 640-645.
- Cressman V. L., Lazarowski E., Homolya L., Boucher R. C., Koller B. H. and Grubb B. R. (1999) Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport. *The Journal of biological chemistry* 274, 26461-26468.
- Crooke A., Guzman-Aranguez A., Peral A., Abdurrahman M. K. and Pintor J. (2008) Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. *Pharmacology & therapeutics* 119, 55-73.
- Cross D. A., Alessi D. R., Cohen P., Andjelkovich M. and Hemmings B. A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Cross D. A., Culbert A. A., Chalmers K. A., Facci L., Skaper S. D. and Reith A. D. (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *Journal of neurochemistry* 77, 94-102.
- Csolle C., Heinrich A., Kittel A. and Sperlagh B. (2008) P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. *Journal of neurochemistry* 106, 347-360.
- Cui H., Meng Y. and Bulleit R. F. (1998) Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta activity regulates proliferation of cultured cerebellar granule cells. *Brain research* 111, 177-188.
- Czajkowski R. and Baranska J. (2002) Cross-talk between the ATP and ADP nucleotide receptor signalling pathways in glioma C6 cells. *Acta biochimica Polonica* 49, 877-889.
- Czajkowski R., Lei L., Sabala P. and Baranska J. (2002) ADP-evoked phospholipase C stimulation and adenylyl cyclase inhibition in glioma C6 cells occur through two distinct nucleotide receptors, P2Y(1) and P2Y(12). *FEBS letters* 513, 179-183.
- Czajkowski R., Banachewicz W., Ilnytska O., Drobot L. B. and Baranska J. (2004) Differential effects of P2Y1 and P2Y12 nucleotide receptors on ERK1/ERK2 and phosphatidylinositol 3-kinase signalling and cell proliferation in serum-deprived and nonstarved glioma C6 cells. *British journal of pharmacology* 141, 497-507.
- Czech C., Tremp G. and Pradier L. (2000) Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in neurobiology* 60, 363-384.
- Chalecka-Franaszek E. and Chuang D. M. (1999) Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8745-8750.
- Chambers J. K., Macdonald L. E., Sarau H. M., Ames R. S., Freeman K., Foley J. J., Zhu Y., McLaughlin M. M., Murdock P., McMillan L., Trill J., Swift A., Aiyar N., Taylor P., Vawter L., Naheed S., Szekeres P., Hervieu G., Scott C., Watson J. M., Murphy A. J., Duzic E., Klein C., Bergsma D. J., Wilson S. and Livi G. P. (2000) A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *The Journal of biological chemistry* 275, 10767-10771.
- Chang K., Hanaoka K., Kumada M. and Takuwa Y. (1995) Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *The Journal of biological chemistry* 270, 26152-26158.
- Chaumont S., Jiang L. H., Penna A., North R. A. and Rassendren F. (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *The Journal of biological chemistry* 279, 29628-29638.
- Cheewatrakoolpong B., Gilchrest H., Anthes J. C. and Greenfeder S. (2005) Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochemical and biophysical research communications* 332, 17-27.
- Chen C. C., Akopian A. N., Sivilotti L., Colquhoun D., Burnstock G. and Wood J. N. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377, 428-431.
- Chen R. W., Qin Z. H., Ren M., Kanai H., Chalecka-Franaszek E., Leeds P. and Chuang D. M. (2003) Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *Journal of neurochemistry* 84, 566-575.
- Cheng Y., Tao Y., Black I. B. and DiCicco-Bloom E. (2001) A single peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates granule cell production and increases cerebellar growth in newborn rats. *Journal of neurobiology* 46, 220-229.
- Chessell I. P., Hatcher J. P., Bountra C., Michel A. D., Hughes J. P., Green P., Egerton J., Murfin M., Richardson J., Peck W. L., Grahames C. B., Casula M. A., Yiangou Y., Birch R., Anand P. and Buell G. N. (2005) Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114, 386-396.
- Chhatrivala M., Ravi R. G., Patel R. I., Boyer J. L., Jacobson K. A. and Harden T. K. (2004) Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y13 receptors by conformational constraint of an ADP analog. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 311, 1038-1043.
- Chin P. C. and D'Mello S. R. (2004) Survival of cultured

- cerebellar granule neurons can be maintained by Akt-dependent and Akt-independent signaling pathways. *Brain Res Mol Brain Res* 127, 140-145.
- Chin P. C., Majdzadeh N. and D'Mello S. R. (2005) Inhibition of GSK3 β is a common event in neuroprotection by different survival factors. *Brain Res Mol Brain Res* 137, 193-201.
- Cho J. H. and Johnson G. V. (2004) Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *Journal of neurochemistry* 88, 349-358.
- Choi H. B., Ryu J. K., Kim S. U. and McLarnon J. G. (2007) Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J Neurosci* 27, 4957-4968.
- Choi R. C., Simon J., Tsim K. W. and Barnard E. A. (2008) Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding. *The Journal of biological chemistry* 283, 11050-11063.
- Chorna N. E., Santiago-Perez L. I., Erb L., Seye C. I., Neary J. T., Sun G. Y., Weisman G. A. and Gonzalez F. A. (2004) P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *Journal of neurochemistry* 91, 119-132.
- Chow Y. W. and Wang H. L. (1998) Functional modulation of P2X2 receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of neurochemistry* 70, 2606-2612.
- Chrysis D., Calikoglu A. S., Ye P. and D'Ercole A. J. (2001) Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci* 21, 1481-1489.
- D'Ambrosi N., Iafrate M., Saba E., Rosa P. and Volonte C. (2007) Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1592-1599.
- D'Ambrosi N., Iafrate M., Vacca F., Amadio S., Tozzi A., Mercuri N. B. and Volonte C. (2006) The P2Y(4) receptor forms homo-oligomeric complexes in several CNS and PNS neuronal cells. *Purinergic signalling* 2, 575-582.
- D'Mello S. R., Anelli R. and Calissano P. (1994) Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Experimental cell research* 211, 332-338.
- D'Mello S. R., Borodezt K. and Soltoff S. P. (1997) Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci* 17, 1548-1560.
- D'Mello S. R., Galli C., Ciotti T. and Calissano P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10989-10993.
- Dahmane N. and Ruiz i Altaba A. (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development (Cambridge, England)* 126, 3089-3100.
- Davies S. P., Reddy H., Caivano M. and Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal* 351, 95-105.
- Davis R. J. (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Molecular reproduction and development* 42, 459-467.
- De Ferrari G. V., Chacon M. A., Barria M. I., Garrido J. L., Godoy J. A., Olivares G., Reyes A. E., Alvarez A., Bronfman M. and Inestrosa N. C. (2003) Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils. *Molecular psychiatry* 8, 195-208.
- De Zeeuw C., Simpsom, C., Hoogenraad, N., Galjart, N., Koekkoek, S., Ruigrok, T. (1998) Microcircuitry and function of the inferior olive. *TINS* 29, 391-400.
- del Rey A., Renigunta V., Dalpke A. H., Leipziger J., Matos J. E., Robaye B., Zuzarte M., Kavelaars A. and Hanley P. J. (2006) Knock-out mice reveal the contributions of P2Y and P2X receptors to nucleotide-induced Ca²⁺ signaling in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 281, 35147-35155.
- Delcommenne M., Tan C., Gray V., Rue L., Woodgett J. and Dedhar S. (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11211-11216.
- Delicado E. G., Jimenez A. I., Carrasquero L. M., Castro E. and Miras-Portugal M. T. (2005) Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes. *Journal of neuroscience research* 81, 789-796.
- Deng Z. and Fyffe R. E. (2004) Expression of P2X7 receptor immunoreactivity in distinct subsets of synaptic terminals in the ventral horn of rat lumbar spinal cord. *Brain Res* 1020, 53-61.
- Denlinger L. C., Fisette P. L., Sommer J. A., Watters J. J., Prabhu U., Dubyak G. R., Proctor R. A. and Bertics P. J. (2001) Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167, 1871-1876.

- DePaoli-Roach A. A. (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *The Journal of biological chemistry* 259, 12144-12152.
- DeRisi J. L., Iyer V. R. and Brown P. O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science (New York, N.Y)* 278, 680-686.
- Desbois-Mouthon C., Cadoret A., Blivet-Van Eggelpoel M. J., Bertrand F., Cherqui G., Perret C. and Capeau J. (2001) Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene* 20, 252-259.
- Deterding R., Retsch-Bogart G., Milgram L., Gibson R., Daines C., Zeitlin P. L., Milla C., Marshall B., Lavange L., Engels J., Mathews D., Gorden J., Schaberg A., Williams J. and Ramsey B. (2005) Safety and tolerability of denufosol tetrasodium inhalation solution, a novel P2Y2 receptor agonist: results of a phase 1/phase 2 multicenter study in mild to moderate cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 39, 339-348.
- Deuchars S. A., Atkinson L., Brooke R. E., Musa H., Milligan C. J., Batten T. F., Buckley N. J., Parson S. H. and Deuchars J. (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 21, 7143-7152.
- Deuticke H. J. (1932) Über den einfluss von adenosin und adenosinphosphorsäuren auf den isolierten Meerschweinuterus. *Pflüg. Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* 230, 537-555.
- Dhulipala P. D., Wang Y. X. and Kotlikoff M. I. (1998) The human P2X4 receptor gene is alternatively spliced. *Gene* 207, 259-266.
- Di Virgilio F. (1995) The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunology today* 16, 524-528.
- Di Virgilio F. (2003) Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *British journal of pharmacology* 140, 441-443.
- Di Virgilio F. (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends in pharmacological sciences* 28, 465-472.
- Diaz-Hernandez M., Sanchez-Nogueiro J. and Miras-Portugal M. T. (2006) Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J Mol Neurosci* 30, 177-180.
- Diaz-Hernandez M., Pintor J., Castro E. and Miras-Portugal M. T. (2002) Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology* 42, 20-33.
- Diaz-Hernandez M., Gomez-Villafuertes R., Hernando F., Pintor J. and Miras-Portugal M. T. (2001) Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X(3) subunits. *Neuroscience letters* 301, 159-162.
- Diaz-Hernandez M., Del Puerto A., Diaz-Hernandez J. I., Diez-Zaera M., Lucas J. J., Garrido J. J. and Miras-Portugal M. T. (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *Journal of cell science* 121, 3717-3728.
- Diaz-Hernandez M., Diez-Zaera M., Sanchez-Nogueiro J., Gomez-Villafuertes R., Canals J. M., Alberch J., Miras-Portugal M. T. and Lucas J. J. (2009) Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.*
- Ding S. and Sachs F. (1999) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *The Journal of general physiology* 113, 695-720.
- Ding S. and Sachs F. (2000) Inactivation of P2X2 purinoceptors by divalent cations. *The Journal of physiology* 522 Pt 2, 199-214.
- Ding V. W., Chen R. H. and McCormick F. (2000) Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 275, 32475-32481.
- Ding Z., Kim S. and Kunapuli S. P. (2006) Identification of a potent inverse agonist at a constitutively active mutant of human P2Y12 receptor. *Molecular pharmacology* 69, 338-345.
- Ding Z., Kim S., Dorsam R. T., Jin J. and Kunapuli S. P. (2003) Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 101, 3908-3914.
- Dixon C. J., White P. J., Hall J. F., Kingston S. and Boarder M. R. (2005) Regulation of human hepatocytes by P2Y receptors: control of glycogen phosphorylase, Ca2+, and mitogen-activated protein kinases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 313, 1305-1313.
- Doble B. W. and Woodgett J. R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science* 116, 1175-1186.
- Donnelly-Roberts D. L. and Jarvis M. F. (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *British journal of pharmacology* 151, 571-579.
- Dowdall M. J., Boyne A. F. and Whittaker V. P. (1974) Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *The Biochemical journal* 140, 1-12.
- Dranoff J. A., O'Neill A. F., Franco A. M., Cai S. Y., Connolly G. C., Ballatori N., Boyer J. L. and Nathanson M. H. (2000) A primitive ATP receptor from the little skate *Raja erinacea*. *The Journal of biological chemistry* 275, 30701-30706.

- Drury A. N. and Szent-Gyorgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology* 68, 213-237.
- Dubyak G. R. and el-Moatassim C. (1993) Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *The American journal of physiology* 265, C577-606.
- Dunn P. M., Liu M., Zhong Y., King B. F. and Burnstock G. (2000) Diinosine pentaphosphate: an antagonist which discriminates between recombinant P₂X₃ and P₂X_{2/3} receptors and between two P₂X receptors in rat sensory neurones. *British journal of pharmacology* 130, 1378-1384.
- Ecke D., Fischer B. and Reiser G. (2008a) Diastereoselectivity of the P₂Y₁₁ nucleotide receptor: mutational analysis. *British journal of pharmacology* 155, 1250-1255.
- Ecke D., Hanck T., Tulapurkar M. E., Schafer R., Kassack M., Stricker R. and Reiser G. (2008b) Hetero-oligomerization of the P₂Y₁₁ receptor with the P₂Y₁ receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P₂Y₁₁ receptor. *The Biochemical journal* 409, 107-116.
- Edelmann L. H. K. (2009) Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies
- Edwards F. A., Gibb A. J. and Colquhoun D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144-147.
- Egan T. M., Cox J. A. and Voigt M. M. (2004) Molecular structure of P₂X receptors. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 821-829.
- Eickhorst A. N., Berson A., Cockayne D., Lester H. A. and Khakh B. S. (2002) Control of P₂X₂ channel permeability by the cytosolic domain. *The Journal of general physiology* 120, 119-131.
- El-Sherif Y., Wieraszko A., Banerjee P. and Penington N. J. (2001) ATP modulates Na⁺ channel gating and induces a non-selective cation current in a neuronal hippocampal cell line. *Brain Res* 904, 307-317.
- Eldar-Finkelman H. (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends in molecular medicine* 8, 126-132.
- Eldar-Finkelman H., Seger R., Vandenheede J. R. and Krebs E. G. (1995) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 987-990.
- Eldar-Finkelman H., Schreyer S. A., Shinohara M. M., LeBoeuf R. C. and Krebs E. G. (1999) Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* 48, 1662-1666.
- Eltzschig H. K., Eckle T., Mager A., Kuper N., Karcher C., Weissmuller T., Boengler K., Schulz R., Robson S. C. and Colgan S. P. (2006) ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circulation research* 99, 1100-1108.
- Emamian E. S., Hall D., Birnbaum M. J., Karayiorgou M. and Gogos J. A. (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nature genetics* 36, 131-137.
- Embi N., Rylatt D. B. and Cohen P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European journal of biochemistry / FEBS* 107, 519-527.
- Engel T., Hernandez F., Avila J. and Lucas J. J. (2006) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26, 5083-5090.
- Ennion S., Hagan S. and Evans R. J. (2000) The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P₂X₁ receptors. *The Journal of biological chemistry* 275, 29361-29367.
- Ennion S. J. and Evans R. J. (2002) P₂X₁ receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochemical and biophysical research communications* 291, 611-616.
- Erb L., Liao Z., Seye C. I. and Weisman G. A. (2006) P₂ receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452, 552-562.
- Etienne-Manneville S. and Hall A. (2003a) Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421, 753-756.
- Etienne-Manneville S. and Hall A. (2003b) Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Current opinion in cell biology* 15, 67-72.
- Evans R. J., Lewis C., Buell G., Valera S., North R. A. and Surprenant A. (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P₂x purinoceptors). *Molecular pharmacology* 48, 178-183.
- Exner C., Weniger G. and Irle E. (2004) Cerebellar lesions in the PICA but not SCA territory impair cognition. *Neurology* 63, 2132-2135.
- Fabre J. E., Nguyen M., Latour A., Keifer J. A., Audoly L. P., Coffman T. M. and Koller B. H. (1999) Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P₂Y₁-deficient mice. *Nature medicine* 5, 1199-1202.
- Fang X., Yu S. X., Lu Y., Bast R. C., Jr., Woodgett J. R. and Mills G. B. (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11960-11965.
- Fang X., Yu S., Tanyi J. L., Lu Y., Woodgett J. R. and Mills G. B. (2002) Convergence of multiple

- signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. *Molecular and cellular biology* 22, 2099-2110.
- Farago M., Dominguez I., Landesman-Bollag E., Xu X., Rosner A., Cardiff R. D. and Seldin D. C. (2005) Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 β promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer research* 65, 5792-5801.
- Farr G. H., 3rd, Ferkey D. M., Yost C., Pierce S. B., Weaver C. and Kimelman D. (2000) Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in Xenopus axis specification. *The Journal of cell biology* 148, 691-702.
- Fath T., Eidenmuller J. and Brandt R. (2002) Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22, 9733-9741.
- Fatokun A. A., Stone T. W. and Smith R. A. (2008) Adenosine receptor ligands protect against a combination of apoptotic and necrotic cell death in cerebellar granule neurons. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung* 186, 151-160.
- Fellin T., Sul J. Y., D'Ascenzo M., Takano H., Pascual O. and Haydon P. G. (2006) Bidirectional astrocyte-neuron communication: the many roles of glutamate and ATP. *Novartis Foundation symposium* 276, 208-217; discussion 217-221, 233-207, 275-281.
- Feng Y. H., Li X., Wang L., Zhou L. and Gorodeski G. I. (2006) A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 281, 17228-17237.
- Ferchmin P. A., Perez D., Eterovic V. A. and de Vellis J. (2003) Nicotinic receptors differentially regulate N-methyl-D-aspartate damage in acute hippocampal slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 305, 1071-1078.
- Ferguson D. R., Kennedy I. and Burton T. J. (1997) ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism? *The Journal of physiology* 505 (Pt 2), 503-511.
- Fernando S. L., Saunders B. M., Sluyter R., Skarratt K. K., Goldberg H., Marks G. B., Wiley J. S. and Britton W. J. (2007) A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175, 360-366.
- Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E., Lemoli R. M., Curti A., Idzko M., Panther E. and Di Virgilio F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176, 3877-3883.
- Fields R. D. and Burnstock G. (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7, 423-436.
- Filippov A. K., Brown D. A. and Barnard E. A. (2000) The P2Y(1) receptor closes the N-type Ca(2+) channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. *British journal of pharmacology* 129, 1063-1066.
- Filippov A. K., Simon J., Barnard E. A. and Brown D. A. (2003) Coupling of the nucleotide P2Y4 receptor to neuronal ion channels. *British journal of pharmacology* 138, 400-406.
- Filippov A. K., Fernandez-Fernandez J. M., Marsh S. J., Simon J., Barnard E. A. and Brown D. A. (2004) Activation and inhibition of neuronal G protein-gated inwardly rectifying K(+) channels by P2Y nucleotide receptors. *Molecular pharmacology* 66, 468-477.
- Fiol C. J., Mahrenholz A. M., Wang Y., Roeske R. W. and Roach P. J. (1987) Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *The Journal of biological chemistry* 262, 14042-14048.
- Fiol C. J., Haseman J. H., Wang Y. H., Roach P. J., Roeske R. W., Kowalczyk M. and DePaoli-Roach A. A. (1988) Phosphoserine as a recognition determinant for glycogen synthase kinase-3: phosphorylation of a synthetic peptide based on the G-component of protein phosphatase-1. *Archives of biochemistry and biophysics* 267, 797-802.
- Fischer L. R. and Glass J. D. (2007) Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neuro-degenerative diseases* 4, 431-442.
- Fischer W. and Krugel U. (2007) P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Current medicinal chemistry* 14, 2429-2455.
- Flodgaard H. and Klenow H. (1982) Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *The Biochemical journal* 208, 737-742.
- Flores R. V., Hernandez-Perez M. G., Aquino E., Garrad R. C., Weisman G. A. and Gonzalez F. A. (2005) Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y2 nucleotide receptor. *Molecular and cellular biochemistry* 280, 35-45.
- Foresta C., Rossato M., Nogara A., Gottardello F., Bordon P. and Di Virgilio F. (1996) Role of P2-purinergic receptors in rat Leydig cell steroidogenesis. *The Biochemical journal* 320 (Pt 2), 499-504.
- Foster C. J., Prosser D. M., Agans J. M., Zhai Y., Smith M. D., Lachowicz J. E., Zhang F. L., Gustafson E., Monsma F. J., Jr., Wiekowski M. T., Abbondanzo S. J., Cook D. N., Bayne M. L., Lira S. A. and Chintala M. S. (2001) Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *The Journal of clinical investigation* 107, 1591-

- 1598.
- Frame S. and Cohen P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical journal* 359, 1-16.
- Frame S., Cohen P. and Biondi R. M. (2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Molecular cell* 7, 1321-1327.
- Franca-Koh J., Yeo M., Fraser E., Young N. and Dale T. C. (2002) The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *The Journal of biological chemistry* 277, 43844-43848.
- Franke H., Krugel U. and Illes P. (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 452, 622-644.
- Franke H., Klimke K., Brinckmann U., Grosche J., Franke M., Sperlagh B., Reichenbach A., Liebert U. G. and Illes P. (2005) P2X(7) receptor-mRNA and -protein in the mouse retina; changes during retinal degeneration in BALBCrds mice. *Neurochemistry international* 47, 235-242.
- Franke H. S. C., Rudolph C., Krügel U., Hengstler JG, Illes P. (2008) P2 receptor-mediated stimulation of the PI3-K/Akt-pathway in vivo. *Glia*.
- Freeman K., Tsui P., Moore D., Emson P. C., Vawter L., Naheed S., Lane P., Bawagan H., Herrity N., Murphy K., Sarau H. M., Ames R. S., Wilson S., Livi G. P. and Chambers J. K. (2001) Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics* 78, 124-128.
- Fricks I. P., Maddileti S., Carter R. L., Lazarowski E. R., Nicholas R. A., Jacobson K. A. and Harden T. K. (2008) UDP is a competitive antagonist at the human P2Y14 receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 325, 588-594.
- Friedman J. I. (2004) Cholinergic targets for cognitive enhancement in schizophrenia: focus on cholinesterase inhibitors and muscarinic agonists. *Psychopharmacology* 174, 45-53.
- Fujii S., Kato H. and Kuroda Y. (2002) Cooperativity between extracellular adenosine 5'-triphosphate and activation of N-methyl-D-aspartate receptors in long-term potentiation induction in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience* 113, 617-628.
- Fujita T., Tozaki-Saitoh H. and Inoue K. (2009) P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* 57, 244-257.
- Fumagalli M., Trincavelli L., Lecca D., Martini C., Ciana P. and Abbracchio M. P. (2004) Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor. *Biochemical pharmacology* 68, 113-124.
- Gachet C. (2001) ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and haemostasis* 86, 222-232.
- Gachet C. (2008) P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thrombosis and haemostasis* 99, 466-472.
- Galindo A., Krnjevic K. and Schwartz S. (1967) Microiontophoretic studies on neurones in the cuneate nucleus. *The Journal of physiology* 192, 359-377.
- Gantier R., Gilbert D., Dumanchin C., Campion D., Davoust D., Toma F. and Frebourg T. (2000) The pathogenic L392V mutation of presenilin 1 decreases the affinity to glycogen synthase kinase-3 beta. *Neuroscience letters* 283, 217-220.
- Garcia-Guzman M., Soto F., Gomez-Hernandez J. M., Lund P. E. and Stuhmer W. (1997) Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Molecular pharmacology* 51, 109-118.
- Garcia-Lecea M., Delicado E. G., Miras-Portugal M. T. and Castro E. (1999) P2X2 characteristics of the ATP receptor coupled to [Ca2+]i increases in cultured Purkinje neurons from neonatal rat cerebellum. *Neuropharmacology* 38, 699-706.
- García-Lecea M. S., R.P.; Soto, F.; Miras-Portugal, M.T.; Castro, E (2000) P2 receptors in cerebellar neurons: Molecular diversity of ionotropic ATP receptors in Purkinje cells. *Drug Dev. Res* 52, 104-113.
- Garrido J. L., Godoy J. A., Alvarez A., Bronfman M. and Inestrosa N. C. (2002) Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *Faseb J* 16, 1982-1984.
- Gartland A., Buckley K. A., Hipskind R. A., Perry M. J., Tobias J. H., Buell G., Chessell I., Bowler W. B. and Gallagher J. A. (2003) Multinucleated osteoclast formation in vivo and in vitro by P2X7 receptor-deficient mice. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 13, 243-253.
- Gasmi L., Cartwright J. L. and McLennan A. G. (1998) The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards diadenosine polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I. *Biochimica et biophysica acta* 1405, 121-127.
- Gautier L., Cope L., Bolstad B. M. and Irizarry R. A. (2004) affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics (Oxford, England)* 20, 307-315.
- Gendreau S., Schirmer J. and Schmalzing G. (2003) Identification of a tubulin binding motif on the P2X2 receptor. *Journal of chromatography* 786, 311-318.
- Gendron F. P., Neary J. T., Theiss P. M., Sun G. Y., Gonzalez F. A. and Weisman G. A. (2003) Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C571-581.
- Gerasimovskaya E. V., Tucker D. A., Weiser-Evans M., Wenzlau J. M., Klemm D. J., Banks M. and Stenmark K. R. (2005) Extracellular ATP-induced proliferation of adventitial fibroblasts requires phosphoinositide 3-kinase, Akt, mammalian target of rapamycin, and p70 S6 kinase signaling pathways. *The Journal of*

- biological chemistry* 280, 1838-1848.
- Gerevich Z., Muller C. and Illes P. (2005) Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons. *European journal of pharmacology* 521, 34-38.
- Gerevich Z., Zadori Z., Muller C., Wirkner K., Schroder W., Rubini P. and Illes P. (2007) Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X3 receptor-channels via G protein-dependent facilitation of their desensitization. *British journal of pharmacology* 151, 226-236.
- Giaroni C., Knight G. E., Zanetti E., Chiaravalli A. M., Lecchini S., Frigo G. and Burnstock G. (2006) Postnatal development of P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 50, 690-704.
- Gil M., Zhen X. and Friedman E. (2003) Prenatal cocaine exposure alters glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) pathway in select rabbit brain areas. *Neuroscience letters* 349, 143-146.
- Gomez-Villafuertes R., Gualix J. and Miras-Portugal M. T. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *Journal of neurochemistry* 77, 84-93.
- Gomez-Villafuertes R., Pintor J., Gualix J. and Miras-Portugal M. T. (2003) GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology* 44, 311-323.
- Gomez-Villafuertes R., Pintor J., Gualix J. and Miras-Portugal M. T. (2004) GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308, 1148-1157.
- Goncalves R. G., Gabrich L., Rosario A., Jr., Takiya C. M., Ferreira M. L., Chiarini L. B., Persechini P. M., Coutinho-Silva R. and Leite M., Jr. (2006) The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney international* 70, 1599-1606.
- Gonzalez F. A., Ahmed A. H., Lustig K. D., Erb L. and Weisman G. A. (1989) Permeabilization of transformed mouse fibroblasts by 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl adenosine 5'-triphosphate and the desensitization of the process. *Journal of cellular physiology* 139, 109-115.
- Goode N., Hughes K., Woodgett J. R. and Parker P. J. (1992) Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *The Journal of biological chemistry* 267, 16878-16882.
- Goodenough S., Conrad S., Skutella T. and Behl C. (2004) Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta protects against kainic acid-induced neurotoxicity in vivo. *Brain Res* 1026, 116-125.
- Gordon J. L. (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *The Biochemical journal* 233, 309-319.
- Gosens R., Dueck G., Rector E., Nunes R. O., Gerthoffer W. T., Unruh H., Zaagsma J., Meurs H. and Halayko A. J. (2007) Cooperative regulation of GSK-3 by muscarinic and PDGF receptors is associated with airway myocyte proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L1348-1358.
- Goto H., Kawano K., Kobayashi I., Sakai H. and Yanagisawa S. (2002) Expression of cyclin D1 and GSK-3beta and their predictive value of prognosis in squamous cell carcinomas of the tongue. *Oral oncology* 38, 549-556.
- Gotoh J., Obata M., Yoshie M., Kasai S. and Ogawa K. (2003) Cyclin D1 over-expression correlates with beta-catenin activation, but not with H-ras mutations, and phosphorylation of Akt, GSK3 beta and ERK1/2 in mouse hepatic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 24, 435-442.
- Gozdz A., Habas A., Jaworski J., Zielinska M., Albrecht J., Chlystun M., Jalili A. and Hetman M. (2003) Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the neuroprotective activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 by cisplatin. *The Journal of biological chemistry* 278, 43663-43671.
- Griffin W. S., Sheng J. G., Royston M. C., Gentleman S. M., McKenzie J. E., Graham D. I., Roberts G. W. and Mrak R. E. (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 8, 65-72.
- Grimes C. A. and Jope R. S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Progress in neurobiology* 65, 391-426.
- Grol M. W., Panupinhu N., Korcok J., Sims S. M. and Dixon S. J. (2009) Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinergic signalling*.
- Gryniewicz G., Poenie M. and Tsien R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260, 3440-3450.
- Gu B. J., Sluyter R., Skarratt K. K., Shemon A. N., Dao-Ung L. P., Fuller S. J., Barden J. A., Clarke A. L., Petrou S. and Wiley J. S. (2004) An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *The Journal of biological chemistry* 279, 31287-31295.
- Gualix J., Pintor J. and Miras-Portugal M. T. (1999) Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *Journal of neurochemistry* 73, 1098-1104.
- Gualix J., Gomez-Villafuertes R., Diaz-Hernandez M. and Miras-Portugal M. T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *Journal of neurochemistry* 87, 160-171.
- Gualix J., Fideu M. D., Pintor J., Rotllan P., Garcia-Carmona F. and Miras-Portugal M. T. (1997) Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal

- medulla. *Faseb J* 11, 981-990.
- Guile S. D., Ince F., Ingall A. H., Kindon N. D., Meghani P. and Mortimore M. P. (2001) The medicinal chemistry of the P2 receptor family. *Progress in medicinal chemistry* 38, 115-187.
- Guo C., Masin M., Qureshi O. S. and Murrell-Lagnado R. D. (2007) Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* 72, 1447-1456.
- Guo Q., Sopher B. L., Furukawa K., Pham D. G., Robinson N., Martin G. M. and Mattson M. P. (1997) Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 17, 4212-4222.
- Guo W., Xu X., Gao X., Burnstock G., He C. and Xiang Z. (2008) Expression of P2X5 receptors in the mouse CNS. *Neuroscience* 156, 673-692.
- Guzman-Aranguez A., Crooke A., Peral A., Hoyle C. H. and Pintor J. (2007) Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics. *Progress in retinal and eye research* 26, 674-687.
- Haines W. R., Migita K., Cox J. A., Egan T. M. and Voigt M. M. (2001) The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *The Journal of biological chemistry* 276, 32793-32798.
- Halse R., Rochford J. J., McCormack J. G., Vandenheede J. R., Hemmings B. A. and Yeaman S. J. (1999) Control of glycogen synthesis in cultured human muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 776-780.
- Han B. H. and Holtzman D. M. (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 20, 5775-5781.
- Hansen M. A., Bennett M. R. and Barden J. A. (1999) Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart. *Journal of the autonomic nervous system* 78, 1-9.
- Harada H., Chan C. M., Loesch A., Unwin R. and Burnstock G. (2000) Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney international* 57, 949-958.
- Hardy A. R., Jones M. L., Mundell S. J. and Poole A. W. (2004) Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood* 104, 1745-1752.
- Hardy L. A., Harvey I. J., Chambers P. and Gillespie J. I. (2000) A putative alternatively spliced variant of the P2X(1) purinoreceptor in human bladder. *Experimental physiology* 85, 461-463.
- Harris T. J. and Peifer M. (2005) Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends in cell biology* 15, 234-237.
- Hart M., Concordet J. P., Lassot I., Albert I., del los Santos R., Durand H., Perret C., Rubinfeld B., Margottin F., Benarous R. and Polakis P. (1999) The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9, 207-210.
- Hart M. J., de los Santos R., Albert I. N., Rubinfeld B. and Polakis P. (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8, 573-581.
- Hartigan J. A. and Johnson G. V. (1999) Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 274, 21395-21401.
- Hashimoto M., Sagara Y., Langford D., Everall I. P., Mallory M., Everson A., Digicaylioglu M. and Masliah E. (2002) Fibroblast growth factor 1 regulates signaling via the glycogen synthase kinase-3beta pathway. Implications for neuroprotection. *The Journal of biological chemistry* 277, 32985-32991.
- Haynes S. E., Hollopeter G., Yang G., Kurpius D., Dailey M. E., Gan W. B. and Julius D. (2006) The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature neuroscience* 9, 1512-1519.
- Hechler B., Cattaneo M. and Gachet C. (2005) The P2 receptors in platelet function. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31, 150-161.
- Hechler B., Eckly A., Ohlmann P., Cazenave J. P. and Gachet C. (1998a) The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *British journal of haematology* 103, 858-866.
- Hechler B., Vigne P., Leon C., Breittmayer J. P., Gachet C. and Frelin C. (1998b) ATP derivatives are antagonists of the P2Y1 receptor: similarities to the platelet ADP receptor. *Molecular pharmacology* 53, 727-733.
- Hechler B., Zhang Y., Eckly A., Cazenave J. P., Gachet C. and Ravid K. (2003) Lineage-specific overexpression of the P2Y1 receptor induces platelet hyper-reactivity in transgenic mice. *J Thromb Haemost* 1, 155-163.
- Hechler B., Nonne C., Roh E. J., Cattaneo M., Cazenave J. P., Lanza F., Jacobson K. A. and Gachet C. (2006) MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarbamyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316, 556-563.
- Hedgepeth C. M., Deardorff M. A., Rankin K. and Klein P. S. (1999) Regulation of glycogen synthase kinase 3beta and downstream Wnt signaling by axin. *Molecular and cellular biology* 19, 7147-7157.

- Heine C., Heimrich B., Vogt J., Wegner A., Illes P. and Franke H. (2006) P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience* 138, 303-311.
- Heine C., Wegner A., Grosche J., Allgaier C., Illes P. and Franke H. (2007) P2 receptor expression in the dopaminergic system of the rat brain during development. *Neuroscience* 149, 165-181.
- Heinrich A., Kittel A., Csölle C., Sylvester Vizi E. and Sperlagh B. (2008) Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord. *Neuropharmacology* 54, 375-386.
- Heneka M. T., Wiesinger H., Dumitrescu-Ozimek L., Riederer P., Feinstein D. L. and Klockgether T. (2001) Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60, 906-916.
- Herbert M. R. C., V.S. (2006) Neuroanatomy and imaging studies, London: Mac Keith Press.
- Hervas C., Perez-Sen R. and Miras-Portugal M. T. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *Journal of neuroscience research* 73, 384-399.
- Hervas C., Perez-Sen R. and Miras-Portugal M. T. (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochemical pharmacology* 70, 770-785.
- Hetman M. and Xia Z. (2000) Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. *Acta neurobiologiae experimentalis* 60, 531-545.
- Hetman M. and Gozdz A. (2004) Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 2050-2055.
- Hetman M., Kanning K., Cavanaugh J. E. and Xia Z. (1999) Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 274, 22569-22580.
- Hetman M., Cavanaugh J. E., Kimelman D. and Xia Z. (2000) Role of glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20, 2567-2574.
- Hetman M., Hsuan S. L., Habas A., Higgins M. J. and Xia Z. (2002) ERK1/2 antagonizes glycogen synthase kinase-3 β -induced apoptosis in cortical neurons. *The Journal of biological chemistry* 277, 49577-49584.
- Hibell A. D., Thompson K. M., Xing M., Humphrey P. P. and Michel A. D. (2001) Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296, 947-957.
- Hillarp N. A., Nilson B. and Hogberg B. (1955) Adenosine triphosphate in the adrenal medulla of the cow. *Nature* 176, 1032-1033.
- Hoebertz A., Meghji S., Burnstock G. and Arnett T. R. (2001) Extracellular ADP is a powerful osteolytic agent: evidence for signaling through the P2Y(1) receptor on bone cells. *Faseb J* 15, 1139-1148.
- Hoebertz A., Mahendran S., Burnstock G. and Arnett T. R. (2002) ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. *Journal of cellular biochemistry* 86, 413-419.
- Hoebertz A., Townsend-Nicholson A., Glass R., Burnstock G. and Arnett T. R. (2000) Expression of P2 receptors in bone and cultured bone cells. *Bone* 27, 503-510.
- Hoeflich K. P., Luo J., Rubie E. A., Tsao M. S., Jin O. and Woodgett J. R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86-90.
- Hoffmann C., Moro S., Nicholas R. A., Harden T. K. and Jacobson K. A. (1999) The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *The Journal of biological chemistry* 274, 14639-14647.
- Hoffmann K., Sixel U., Di Pasquale F. and von Kugelgen I. (2008) Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y(12)-receptor. *Biochemical pharmacology* 76, 1201-1213.
- Holnthoner W., Pillinger M., Groger M., Wolff K., Ashton A. W., Albanese C., Neumeister P., Pestell R. G. and Petzelbauer P. (2002) Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 45847-45853.
- Holton F. A. and Holton P. (1953) The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *The Journal of physiology* 119, 50P-51P.
- Holton F. A. and Holton P. (1954) The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *The Journal of physiology* 126, 124-140.
- Holton P. (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *The Journal of physiology* 145, 494-504.
- Hollopeter G., Jantzen H. M., Vincent D., Li G., England L., Ramakrishnan V., Yang R. B., Nurden P., Nurden A., Julius D. and Conley P. B. (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409, 202-207.
- Homolya L., Watt W. C., Lazarowski E. R., Koller B. H. and Boucher R. C. (1999) Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y(2) receptor (-/-) mice. *The Journal of biological chemistry* 274, 26454-26460.

- Hongisto V., Smeds N., Brecht S., Herdegen T., Courtney M. J. and Coffey E. T. (2003) Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Molecular and cellular biology* 23, 6027-6036.
- Honore P., Donnelly-Roberts D., Namovic M. T., Hsieh G., Zhu C. Z., Mikusa J. P., Hernandez G., Zhong C., Gauvin D. M., Chandran P., Harris R., Medrano A. P., Carroll W., Marsh K., Sullivan J. P., Faltynek C. R. and Jarvis M. F. (2006) A-740003 [N-(1-{{[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 1376-1385.
- Housley G. D. (2000) Physiological effects of extracellular nucleotides in the inner ear. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27, 575-580.
- Housley G. D., Luo L. and Ryan A. F. (1998) Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization. *The Journal of comparative neurology* 393, 403-414.
- Housley G. D., Bringmann A. and Reichenbach A. (2009) Purinergic signaling in special senses. *Trends in neurosciences* 32, 128-141.
- Housley G. D., Jagger D. J., Greenwood D., Raybould N. P., Salih S. G., Jarlebar L. E., Vlajkovic S. M., Kanjhan R., Nikolic P., Munoz D. J. and Thorne P. R. (2002) Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission. *Audiology & neuro-otology* 7, 55-61.
- Hoyle C. H., Pintor J., Gualix J. and Miras-Portugal M. T. (1997) Antagonism of P2X receptors in guinea-pig vas deferens by diinosine pentaphosphate. *European journal of pharmacology* 333, R1-2.
- Hu B., Senkler C., Yang A., Soto F. and Liang B. T. (2002) P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *The Journal of biological chemistry* 277, 15752-15757.
- Huang L. C., Ryan A. F., Cockayne D. A. and Housley G. D. (2006) Developmentally regulated expression of the P2X3 receptor in the mouse cochlea. *Histochemistry and cell biology* 125, 681-692.
- Hughes K., Ramakrishna S., Benjamin W. B. and Woodgett J. R. (1992) Identification of multifunctional ATP-citrate lyase kinase as the alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3. *The Biochemical journal* 288 (Pt 1), 309-314.
- Hughes K., Nikolakaki E., Plyte S. E., Totty N. F. and Woodgett J. R. (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* 12, 803-808.
- Humphreys B. D., Virginio C., Surprenant A., Rice J. and Dubyak G. R. (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Molecular pharmacology* 54, 22-32.
- Hung A. C. and Sun S. H. (2002) The P2X(7) receptor-mediated phospholipase D activation is regulated by both PKC-dependent and PKC-independent pathways in a rat brain-derived Type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cellular signalling* 14, 83-92.
- Hung A. C., Chu Y. J., Lin Y. H., Weng J. Y., Chen H. B., Au Y. C. and Sun S. H. (2005) Roles of protein kinase C in regulation of P2X7 receptor-mediated calcium signalling of cultured type-2 astrocyte cell line, RBA-2. *Cellular signalling* 17, 1384-1396.
- Huwiler A., Rolz W., Dorsch S., Ren S. and Pfeilschifter J. (2002) Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y(2) purinoceptor in renal mesangial cells. *British journal of pharmacology* 136, 520-529.
- Iacovelli L., Bruno V., Salvatore L., Melchiorri D., Gradini R., Caricasole A., Barletta E., De Blasi A. and Nicoletti F. (2002) Native group-III metabotropic glutamate receptors are coupled to the mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *Journal of neurochemistry* 82, 216-223.
- Illario M., Cavallo A. L., Bayer K. U., Di Matola T., Fenzi G., Rossi G. and Vitale M. (2003) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *The Journal of biological chemistry* 278, 45101-45108.
- Inbe H., Watanabe S., Miyawaki M., Tanabe E. and Encinas J. A. (2004) Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine. *The Journal of biological chemistry* 279, 19790-19799.
- Inoue K., Koizumi S. and Tsuda M. (2007) The role of nucleotides in the neuron--glia communication responsible for the brain functions. *Journal of neurochemistry* 102, 1447-1458.
- Irino Y., Nakamura Y., Inoue K., Kohsaka S. and Ohsawa K. (2008) Akt activation is involved in P2Y12 receptor-mediated chemotaxis of microglia. *Journal of neuroscience research* 86, 1511-1519.
- Ito M. (1984) The cerebellum and neural control. New York: Raven.
- Ito M. (2002) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci* 3, 896-902.
- Ivanov A. A., Costanzi S. and Jacobson K. A. (2006) Defining the nucleotide binding sites of P2Y receptors using rhodopsin-based homology modeling. *Journal of computer-aided molecular design* 20, 417-426.
- Ivanov A. A., Ko H., Cosyn L., Maddileti S., Besada P., Fricks I., Costanzi S., Harden T. K., Calenbergh S.

- V. and Jacobson K. A. (2007) Molecular modeling of the human P2Y2 receptor and design of a selective agonist, 2'-amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-triphosphate. *Journal of medicinal chemistry* 50, 1166-1176.
- Jacobson K. A., Jarvis M. F. and Williams M. (2002) Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *Journal of medicinal chemistry* 45, 4057-4093.
- Jacobson K. A., Costanzi S., Ohno M., Joshi B. V., Besada P., Xu B. and Tchilibon S. (2004) Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Current topics in medicinal chemistry* 4, 805-819.
- Jahr C. E. and Jessell T. M. (1983) ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* 304, 730-733.
- Janssens R., Paindavoine P., Parmentier M. and Boeynaems J. M. (1999) Human P2Y2 receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *British journal of pharmacology* 127, 709-716.
- Jantzen H. M., Gousset L., Bhaskar V., Vincent D., Tai A., Reynolds E. E. and Conley P. B. (1999) Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thrombosis and haemostasis* 81, 111-117.
- Jasti J., Furukawa H., Gonzales E. B. and Gouaux E. (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449, 316-323.
- Jia J., Tong C. and Jiang J. (2003) Smoothened transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes & development* 17, 2709-2720.
- Jia J., Amanai K., Wang G., Tang J., Wang B. and Jiang J. (2002) Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus. *Nature* 416, 548-552.
- Jiang L. H., Mackenzie A. B., North R. A. and Surprenant A. (2000a) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Molecular pharmacology* 58, 82-88.
- Jiang L. H., Rassendren F., Surprenant A. and North R. A. (2000b) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *The Journal of biological chemistry* 275, 34190-34196.
- Jiang L. H., Kim M., Spelta V., Bo X., Surprenant A. and North R. A. (2003a) Subunit arrangement in P2X receptors. *J Neurosci* 23, 8903-8910.
- Jiang X., Zhu D., Okagaki P., Lipsky R., Wu X., Banaudha K., Mearow K., Strauss K. I. and Marini A. M. (2003b) N-methyl-D-aspartate and TrkB receptor activation in cerebellar granule cells: an in vitro model of preconditioning to stimulate intrinsic survival pathways in neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 993, 134-145; discussion 159-160.
- Jimenez A. I., Castro E., Delicado E. G. and Miras-Portugal M. T. (1998) Potentiation of adenosine 5'-triphosphate calcium responses by diadenosine pentaphosphate in individual rat cerebellar astrocytes. *Neuroscience letters* 246, 109-111.
- Jimenez A. I., Castro E., Delicado E. G. and Miras-Portugal M. T. (2002) Specific diadenosine pentaphosphate receptor coupled to extracellular regulated kinases in cerebellar astrocytes. *Journal of neurochemistry* 83, 299-308.
- Jin J. and Kunapuli S. P. (1998) Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8070-8074.
- Jin R., Banke T. G., Mayer M. L., Traynelis S. F. and Gouaux E. (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nature neuroscience* 6, 803-810.
- Jo Y. H. and Schlichter R. (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience* 2, 241-245.
- Jo Y. H. and Role L. W. (2002) Cholinergic modulation of purinergic and GABAergic co-transmission at in vitro hypothalamic synapses. *Journal of neurophysiology* 88, 2501-2508.
- Jones C. A., Vial C., Sellers L. A., Humphrey P. P., Evans R. J. and Chessell I. P. (2004) Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype. *Molecular pharmacology* 65, 979-985.
- Jones C. A., Chessell I. P., Simon J., Barnard E. A., Miller K. J., Michel A. D. and Humphrey P. P. (2000) Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *British journal of pharmacology* 129, 388-394.
- Jonkers J., Korswagen H. C., Acton D., Breuer M. and Berns A. (1997) Activation of a novel proto-oncogene, *Frat1*, contributes to progression of mouse T-cell lymphomas. *The EMBO journal* 16, 441-450.
- Joost P. and Methner A. (2002) Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome biology* 3, RESEARCH0063.
- Jope R. S. and Johnson G. V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in biochemical sciences* 29, 95-102.
- Jope R. S. and Roh M. S. (2006) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Current drug targets* 7, 1421-1434.
- Jope R. S., Yuskaitis C. J. and Beurel E. (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochemical research* 32, 577-595.
- Kaga S., Zhan L., Altaf E. and Maulik N. (2006) Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin

- promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 40, 138-147.
- Kaidanovich-Beilin O., Milman A., Weizman A., Pick C. G. and Eldar-Finkelman H. (2004) Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biological psychiatry* 55, 781-784.
- Kanehisa M., Araki M., Goto S., Hattori M., Hirakawa M., Itoh M., Katayama T., Kawashima S., Okuda S., Tokimatsu T. and Yamanishi Y. (2008) KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research* 36, D480-484.
- Kang D. E., Soriano S., Xia X., Eberhart C. G., De Strooper B., Zheng H. and Koo E. H. (2002) Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* 110, 751-762.
- Kang D. E., Soriano S., Frosch M. P., Collins T., Naruse S., Sisodia S. S., Leibowitz G., Levine F. and Koo E. H. (1999) Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of beta-catenin: differential activity of Alzheimer's disease-linked PS1 mutants in the beta-catenin-signaling pathway. *J Neurosci* 19, 4229-4237.
- Katanaev V. L., Ponzielli R., Semeriva M. and Tomlinson A. (2005) Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila. *Cell* 120, 111-122.
- Kauffenstein G., Bergmeier W., Eckly A., Ohlmann P., Leon C., Cazenave J. P., Nieswandt B. and Gachet C. (2001) The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha_{IIb}beta₃ integrin—a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS letters* 505, 281-290.
- Kaufmann S. H. and Hengartner M. O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in cell biology* 11, 526-534.
- Kaulich M. S. F., Mayer R., Müller I., Müller C. (2003) Flavonoids - novel lead compounds for the development of P2Y₂ receptor antagonists. *Drug development research* 59, 72-81.
- Kaytor M. D. and Orr H. T. (2002) The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current opinion in neurobiology* 12, 275-278.
- Ke H. Z., Qi H., Weidema A. F., Zhang Q., Panupinthu N., Crawford D. T., Grasser W. A., Paralkar V. M., Li M., Audoly L. P., Gabel C. A., Jee W. S., Dixon S. J., Sims S. M. and Thompson D. D. (2003) Deletion of the P2X₇ nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 17, 1356-1367.
- Keith R. F., Elliot, F. (1979) The preparation and use of isolated cells for metabolic studies. *Tech. Metabol. Res.* B204, 1-20.
- Kellerman D., Evans R., Mathews D. and Shaffer C. (2002) Inhaled P2Y₂ receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Advanced drug delivery reviews* 54, 1463-1474.
- Kellerman D., Rossi Mospan A., Engels J., Schaberg A., Gorden J. and Smiley L. (2008) Denufosol: a review of studies with inhaled P2Y₂ agonists that led to Phase 3. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 21, 600-607.
- Kennedy C. (2005) P2X receptors: targets for novel analgesics? *Neuroscientist* 11, 345-356.
- Kennedy C., Qi A. D., Herold C. L., Harden T. K. and Nicholas R. A. (2000) ATP, an agonist at the rat P2Y₄ receptor, is an antagonist at the human P2Y₄ receptor. *Molecular pharmacology* 57, 926-931.
- Khakh B. S., Gittermann D., Cockayne D. A. and Jones A. (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci* 23, 7426-7437.
- Khakh B. S., Fisher J. A., Nashmi R., Bowser D. N. and Lester H. A. (2005) An angstrom scale interaction between plasma membrane ATP-gated P2X₂ and alpha₄beta₂ nicotinic channels measured with fluorescence resonance energy transfer and total internal reflection fluorescence microscopy. *J Neurosci* 25, 6911-6920.
- Khakh B. S., Burnstock G., Kennedy C., King B. F., North R. A., Seguela P., Voigt M. and Humphrey P. P. (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews* 53, 107-118.
- Kieffmann R., Islam M. N., Lindert J., Parthasarathi K. and Bhattacharya J. (2009) Paracrine purinergic signaling determines endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Kim H. S., Ohno M., Xu B., Kim H. O., Choi Y., Ji X. D., Maddileti S., Marquez V. E., Harden T. K. and Jacobson K. A. (2003a) 2-Substitution of adenine nucleotide analogues containing a bicyclo[3.1.0] hexane ring system locked in a northern conformation: enhanced potency as P2Y₁ receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 46, 4974-4987.
- Kim H. S., Kim E. M., Lee J. P., Park C. H., Kim S., Seo J. H., Chang K. A., Yu E., Jeong S. J., Chong Y. H. and Suh Y. H. (2003b) C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. *Faseb J* 17, 1951-1953.
- Kim L. and Kimmel A. R. (2000) GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Current opinion in genetics & development* 10, 508-514.
- Kim L., Liu J. and Kimmel A. R. (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* 99, 399-408.

- Kim M., Jiang L. H., Wilson H. L., North R. A. and Surprenant A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO journal* 20, 6347-6358.
- Kim S. E., Lee W. J. and Choi K. Y. (2007) The PI3 kinase-Akt pathway mediates Wnt3a-induced proliferation. *Cellular signalling* 19, 511-518.
- Kim S. G., Soltysiak K. A., Gao Z. G., Chang T. S., Chung E. and Jacobson K. A. (2003c) Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in astrocytes is prevented by the activation of P2Y6, but not P2Y4 nucleotide receptors. *Biochemical pharmacology* 65, 923-931.
- Kim Y. C., Lee J. S., Sak K., Marteau F., Mamedova L., Boeynaems J. M. and Jacobson K. A. (2005) Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor. *Biochemical pharmacology* 70, 266-274.
- King B. F. and Townsend-Nicholson A. (2008) Involvement of P2Y1 and P2Y11 purinoceptors in parasympathetic inhibition of colonic smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 324, 1055-1063.
- King B. F., Wildman S. S., Ziganshina L. E., Pintor J. and Burnstock G. (1997) Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor. *British journal of pharmacology* 121, 1445-1453.
- King B. F., Liu M., Pintor J., Gualix J., Miras-Portugal M. T. and Burnstock G. (1999) Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *British journal of pharmacology* 128, 981-988.
- King B. F., Townsend-Nicholson A., Wildman S. S., Thomas T., Spyer K. M. and Burnstock G. (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 20, 4871-4877.
- King B. F. T.-N., A (2003) Nucleoside and nucleotide receptors. *Tocris Rev.* 23, 1-11.
- King T. D. and Jope R. S. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 16, 597-601.
- King T. D., Song L. and Jope R. S. (2006) AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3. *Biochemical pharmacology* 71, 1637-1647.
- Kishida S., Yamamoto H., Ikeda S., Kishida M., Sakamoto I., Koyama S. and Kikuchi A. (1998) Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *The Journal of biological chemistry* 273, 10823-10826.
- Kitagawa M., Hatakeyama S., Shirane M., Matsumoto M., Ishida N., Hattori K., Nakamichi I., Kikuchi A., Nakayama K. and Nakayama K. (1999) An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *The EMBO journal* 18, 2401-2410.
- Klein P. S. and Melton D. A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8455-8459.
- Kloda A., Clements J. D., Lewis R. J. and Adams D. J. (2004) Adenosine triphosphate acts as both a competitive antagonist and a positive allosteric modulator at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular pharmacology* 65, 1386-1396.
- Ko W. H., Au C. L. and Yip C. Y. (2003) Multiple purinergic receptors lead to intracellular calcium increases in cultured rat Sertoli cells. *Life sciences* 72, 1519-1535.
- Kobayashi K., Yamanaka H., Fukuoka T., Dai Y., Obata K. and Noguchi K. (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J Neurosci* 28, 2892-2902.
- Kobayashi K., Fukuoka T., Yamanaka H., Dai Y., Obata K., Tokunaga A. and Noguchi K. (2005) Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *The Journal of comparative neurology* 481, 377-390.
- Koizumi S., Saito Y., Nakazawa K., Nakajima K., Sawada J. I., Kohsaka S., Illes P. and Inoue K. (2002) Spatial and temporal aspects of Ca²⁺ signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes. *Life sciences* 72, 431-442.
- Koizumi S., Shigemoto-Mogami Y., Nasu-Tada K., Shinozaki Y., Ohsawa K., Tsuda M., Joshi B. V., Jacobson K. A., Kohsaka S. and Inoue K. (2007) UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091-1095.
- Kotova O., Galuska D., Essen-Gustavsson B. and Chibalin A. V. (2006a) Metabolic and signaling events mediated by cardiotonic steroid ouabain in rat skeletal muscle. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 52, 48-57.
- Kotova O., Al-Khalili L., Talia S., Hooke C., Fedorova O. V., Bagrov A. Y. and Chibalin A. V. (2006b) Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 281, 20085-20094.
- Krammer P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krause R. M., Buisson B., Bertrand S., Corringer P. J., Galzi J. L., Changeux J. P. and Bertrand D. (1998) Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular pharmacology* 53, 283-294.
- Krishtal O. A., Marchenko S. M. and Pidoplichko V. I. (1983) Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neuroscience letters* 35, 41-45.

- Krylova O., Messenger M. J. and Salinas P. C. (2000) Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3beta. *The Journal of cell biology* 151, 83-94.
- Krystal J. H., D'Souza D. C., Mathalon D., Perry E., Belger A. and Hoffman R. (2003) NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology* 169, 215-233.
- Kukulski F., Levesque S. A., Lavoie E. G., Lecka J., Bigonnesse F., Knowles A. F., Robson S. C., Kirley T. L. and Seigny J. (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic signalling* 1, 193-204.
- Kunapuli S. P., Ding Z., Dorsam R. T., Kim S., Murugappan S. and Quinton T. M. (2003) ADP receptors--targets for developing antithrombotic agents. *Current pharmaceutical design* 9, 2303-2316.
- Lafon-Cazal M., Perez V., Bockaert J. and Marin P. (2002) Akt mediates the anti-apoptotic effect of NMDA but not that induced by potassium depolarization in cultured cerebellar granule cells. *The European journal of neuroscience* 16, 575-583.
- Lagerstrom M. C. and Schioth H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7, 339-357.
- Laitinen J. T., Uri A., Raidaru G. and Miettinen R. (2001) [(35)S]GTPgammaS autoradiography reveals a wide distribution of G(i/o)-linked ADP receptors in the nervous system: close similarities with the platelet P2Y(ADP) receptor. *Journal of neurochemistry* 77, 505-518.
- Lalo U., Pankratov Y., Wichert S. P., Rossner M. J., North R. A., Kirchhoff F. and Verkhratsky A. (2008) P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 28, 5473-5480.
- Langer D., Hammer K., Koszalka P., Schrader J., Robson S. and Zimmermann H. (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell and tissue research* 334, 199-217.
- Laruelle M., Kegeles L. S. and Abi-Dargham A. (2003) Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003, 138-158.
- Lazarowski E. (2004) Constitutive and regulated release of nucleotides and UDP-sugars. *4th International symposium of nucleosides and nucleotides. Chapel Hill*.
- Lazarowski E. (2006) Regulated release of nucleotides and UDP sugars from astrocytoma cells. *Novartis Foundation symposium* 276, 73-84; discussion 84-90, 107-112, 275-181.
- Le K. T., Babinski K. and Seguela P. (1998) Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci* 18, 7152-7159.
- Le K. T., Boue-Grabot E., Archambault V. and Seguela P. (1999) Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *The Journal of biological chemistry* 274, 15415-15419.
- Le K. T., Paquet M., Nouel D., Babinski K. and Seguela P. (1997) Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS letters* 418, 195-199.
- Lecca D., Trincavelli M. L., Gelosa P., Sironi L., Ciana P., Fumagalli M., Villa G., Verderio C., Grumelli C., Guerrini U., Tremoli E., Rosa P., Cuboni S., Martini C., Buffo A., Cimino M. and Abbracchio M. P. (2008) The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. *PLoS ONE* 3, e3579.
- Lechner S. G. and Boehm S. (2004) Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors. *Purinergic signalling* 1, 31-41.
- Lee J. and Kim M. S. (2007) The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes research and clinical practice* 77 Suppl 1, S49-57.
- Lee J. H., Chiba T. and Marcus D. C. (2001) P2X2 receptor mediates stimulation of parasensory cation absorption by cochlear outer sulcus cells and vestibular transitional cells. *J Neurosci* 21, 9168-9174.
- Lee S. Y. and O'Grady S. M. (2003) Modulation of ion channel function by P2Y receptors. *Cell biochemistry and biophysics* 39, 75-88.
- Lefers M. A. and Holmgren R. (2002) Ci proteolysis: regulation by a constellation of phosphorylation sites. *Curr Biol* 12, R422-423.
- Leis H., Segrelles C., Ruiz S., Santos M. and Paramio J. M. (2002) Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. *Molecular carcinogenesis* 35, 180-185.
- Lenz G., Gottfried C., Luo Z., Avruch J., Rodnight R., Nie W. J., Kang Y. and Neary J. T. (2000) P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes. *British journal of pharmacology* 129, 927-936.
- Leon C., Freund M., Latchoumanan O., Farret A., Petit P., Cazenave J. P. and Gachet C. (2005) The P2Y(1) receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice. *Purinergic signalling* 1, 145-151.
- Leon C., Hechler B., Freund M., Eckly A., Vial C., Ohlmann P., Dierich A., LeMeur M., Cazenave J. P. and Gachet C. (1999) Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *The Journal of clinical*

- investigation 104, 1731-1737.
- Leon D., Hervas C. and Miras-Portugal M. T. (2006) P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *The European journal of neuroscience* 23, 2999-3013.
- Leon D., Sanchez-Nogueiro J., Marin-Garcia P. and Miras-Portugal M. A. (2008) Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry international* 52, 1148-1159.
- Leroy K. and Brion J. P. (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *Journal of chemical neuroanatomy* 16, 279-293.
- Leroy K., Boutajangout A., Authelet M., Woodgett J. R., Anderton B. H. and Brion J. P. (2002) The active form of glycogen synthase kinase-3beta is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 103, 91-99.
- Lesort M., Jope R. S. and Johnson G. V. (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *Journal of neurochemistry* 72, 576-584.
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D. M., Oshima J., Pettingell W. H., Yu C. E., Jondro P. D., Schmidt S. D., Wang K. and et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, N.Y)* 269, 973-977.
- Lewis C., Neidhart S., Holy C., North R. A., Buell G. and Surprenant A. (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432-435.
- Li H., Zhu H., Xu C. J. and Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li L., Yuan H., Weaver C. D., Mao J., Farr G. H., 3rd, Sussman D. J., Jonkers J., Kimelman D. and Wu D. (1999) Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *The EMBO journal* 18, 4233-4240.
- Li M., Wang X., Meintzer M. K., Laessig T., Birnbaum M. J. and Heidenreich K. A. (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Molecular and cellular biology* 20, 9356-9363.
- Li N., Wang C., Wu Y., Liu X. and Cao X. (2009) Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II promotes cell cycle progression by directly activating MEK1 and subsequently modulating p27 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 284, 3021-3027.
- Li X., Zhu W., Roh M. S., Friedman A. B., Rosborough K. and Jope R. S. (2004) In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 29, 1426-1431.
- Lim J. Y., Park S. I., Oh J. H., Kim S. M., Jeong C. H., Jun J. A., Lee K. S., Oh W., Lee J. K. and Jeun S. S. (2008) Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *Journal of neuroscience research* 86, 2168-2178.
- Lin R. Z., Hu Z. W., Chin J. H. and Hoffman B. B. (1997) Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 272, 31196-31202.
- Linseman D. A., Butts B. D., Precht T. A., Phelps R. A., Le S. S., Laessig T. A., Bouchard R. J., Florez-McClure M. L. and Heidenreich K. A. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24, 9993-10002.
- Liu C., Li Y., Semenov M., Han C., Baeg G. H., Tan Y., Zhang Z., Lin X. and He X. (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-847.
- Liu G. J., Brockhausen J. and Bennett M. R. (2003) P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci* 108, 12-16.
- Liu T., DeCostanzo A. J., Liu X., Wang H., Hallagan S., Moon R. T. and Malbon C. C. (2001) G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science (New York, N.Y)* 292, 1718-1722.
- Liu X., Ma W., Surprenant A. and Jiang L. H. (2008a) Identification of the amino acid residues in the extracellular domain of rat P2X(7) receptor involved in functional inhibition by acidic pH. *British journal of pharmacology*.
- Liu X., Surprenant A., Mao H. J., Roger S., Xia R., Bradley H. and Jiang L. H. (2008b) Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Molecular pharmacology* 73, 252-259.
- Lonze B. E. and Ginty D. D. (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Lossi L., Zagzag D., Greco M. A. and Merighi A. (1998) Apoptosis of undifferentiated progenitors and granule cell precursors in the postnatal human cerebellar cortex correlates with expression of BCL-2, ICE, and CPP32 proteins. *The Journal of comparative neurology* 399, 359-372.
- Luke T. M. and Hexum T. D. (2008) UTP and ATP increase extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in bovine chromaffin cells through

- epidermal growth factor receptor transactivation. *Purinergic signalling* 4, 323-330.
- Lum L., Zhang C., Oh S., Mann R. K., von Kessler D. P., Taipale J., Weis-Garcia F., Gong R., Wang B. and Beachy P. A. (2003) Hedgehog signal transduction via Smoothened association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Molecular cell* 12, 1261-1274.
- Lundy P. M., Hamilton M. G., Mi L., Gong W., Vair C., Sawyer T. W. and Frew R. (2002) Stimulation of Ca(2+) influx through ATP receptors on rat brain synaptosomes: identification of functional P2X(7) receptor subtypes. *British journal of pharmacology* 135, 1616-1626.
- Lustig B. and Behrens J. (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of cancer research and clinical oncology* 129, 199-221.
- Lustig K. D., Shiao A. K., Brake A. J. and Julius D. (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5113-5117.
- Luthardt J., Borvendeg S. J., Sperlagh B., Poelchen W., Wirkner K. and Illes P. (2003) P2Y(1) receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochemistry international* 42, 161-172.
- Luthje J. and Ogilvie A. (1983) The presence of diadenosine 5',5'''-P1,P3-triphosphate (Ap3A) in human platelets. *Biochemical and biophysical research communications* 115, 253-260.
- Lynch K. J., Touma E., Niforatos W., Kage K. L., Burgard E. C., van Biesen T., Kowaluk E. A. and Jarvis M. F. (1999) Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Molecular pharmacology* 56, 1171-1181.
- Ma W., Korngreen A., Uzlaner N., Priel Z. and Silberberg S. D. (1999) Extracellular sodium regulates airway ciliary motility by inhibiting a P2X receptor. *Nature* 400, 894-897.
- Ma W., Korngreen A., Weil S., Cohen E. B., Priel A., Kuzin L. and Silberberg S. D. (2006) Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *The Journal of physiology* 571, 503-517.
- Malaval C., Laffargue M., Barbaras R., Rolland C., Peres C., Champagne E., Perret B., Terce F., Collet X. and Martinez L. O. (2009) RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cellular signalling* 21, 120-127.
- Mamedova L. K., Gao Z. G. and Jacobson K. A. (2006) Regulation of death and survival in astrocytes by ADP activating P2Y1 and P2Y12 receptors. *Biochemical pharmacology* 72, 1031-1041.
- Mamedova L. K., Joshi B. V., Gao Z. G., von Kugelgen I. and Jacobson K. A. (2004) Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors. *Biochemical pharmacology* 67, 1763-1770.
- Marchese A., George S. R., Kolakowski L. F., Jr., Lynch K. R. and O'Dowd B. F. (1999) Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 20, 370-375.
- Marin-Garcia P. (2007) Receptores de nucleótidos P2X presentes en Sistema Nervioso Central de Ratón: Caracterización y función. *Tesis Doctoral*.
- Marin-Garcia P., Sanchez-Nogueiro J., Gomez-Villafuertes R., Leon D. and Miras-Portugal M. T. (2008) Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. *Neuroscience* 151, 361-373.
- Marini A. M., Rabin S. J., Lipsky R. H. and Mocchetti I. (1998) Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *The Journal of biological chemistry* 273, 29394-29399.
- Marini A. M., Jiang X., Wu X., Tian F., Zhu D., Okagaki P. and Lipsky R. H. (2004) Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restorative neurology and neuroscience* 22, 121-130.
- Marteau F., Communi D., Boeynaems J. M. and Suarez Gonzalez N. (2004) Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 76, 796-803.
- Marteau F., Le Poul E., Communi D., Communi D., Labouret C., Savi P., Boeynaems J. M. and Gonzalez N. S. (2003) Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Molecular pharmacology* 64, 104-112.
- Martin M., Rehani K., Jope R. S. and Michalek S. M. (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology* 6, 777-784.
- Martinez F. E., Crill W. E. and Kennedy T. T. (1971) Electrogenesis of cerebellar Purkinje cell responses in cats. *Journal of neurophysiology* 34, 348-356.
- Martinou J. C. and Green D. R. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nature reviews* 2, 63-67.
- Mateo J., Miras-Portugal M. T. and Castro E. (1996) Co-existence of P2Y-and PPADS-insensitive P2U-purinoceptors in endothelial cells from adrenal medulla. *British journal of pharmacology* 119, 1223-1232.
- Mateo J., Garcia-Lecea M., Miras-Portugal M. T. and Castro E. (1998) Ca2+ signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 18, 1704-1712.
- Matute C. (2008) P2X7 receptors in oligodendrocytes:

- a novel target for neuroprotection. *Molecular neurobiology* 38, 123-128.
- McLennan A. G. (1992) Ap4A and other dinucleoside polyphosphates. *CRC Press, Boca Raton, Florida*.
- McManus E. J., Sakamoto K., Armit L. J., Ronaldson L., Shpiro N., Marquez R. and Alessi D. R. (2005) Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *The EMBO journal* 24, 1571-1583.
- Meijer L., Flajolet M. and Greengard P. (2004) Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends in pharmacological sciences* 25, 471-480.
- Merry D. E. and Korsmeyer S. J. (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annual review of neuroscience* 20, 245-267.
- Meyer-Franke A., Kaplan M. R., Pfrieger F. W. and Barres B. A. (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15, 805-819.
- Meyer-Franke A., Wilkinson G. A., Kruttgen A., Hu M., Munro E., Hanson M. G., Jr., Reichardt L. F. and Barres B. A. (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21, 681-693.
- Miller K. J., Michel A. D., Chessell I. P. and Humphrey P. P. (1998) Cibacron blue allosterically modulates the rat P2X4 receptor. *Neuropharmacology* 37, 1579-1586.
- Miller T. M., Tansey M. G., Johnson E. M., Jr. and Creedon D. J. (1997) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization- and insulin-like growth factor I-mediated survival of cerebellar granule cells. *The Journal of biological chemistry* 272, 9847-9853.
- Mio K., Kubo Y., Ogura T., Yamamoto T. and Sato C. (2005) Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. *Biochemical and biophysical research communications* 337, 998-1005.
- Miras-Portugal M. T., Diaz-Hernandez M., Giraldez L., Hervas C., Gomez-Villafuertes R., Sen R. P., Gualix J. and Pintor J. (2003) P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochemical research* 28, 1597-1605.
- Mishra S. K., Braun N., Shukla V., Fullgrabe M., Schomerus C., Korf H. W., Gachet C., Ikehara Y., Sevigny J., Robson S. C. and Zimmermann H. (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development (Cambridge, England)* 133, 675-684.
- Mitchell C. H., Lu W., Hu H., Zhang X., Reigada D. and Zhang M. (2008) The P2X(7) receptor in retinal ganglion cells: A neuronal model of pressure-induced damage and protection by a shifting purinergic balance. *Purinergic signalling* 4, 313-321.
- Moers A., Nieswandt B., Massberg S., Wettschureck N., Gruner S., Konrad I., Schulte V., Aktas B., Gratacap M. P., Simon M. I., Gawaz M. and Offermanns S. (2003) G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nature medicine* 9, 1418-1422.
- Montana V., Malarkey E. B., Verderio C., Matteoli M. and Parpura V. (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54, 700-715.
- Moon R. T., Bowerman B., Boutros M. and Perrimon N. (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science (New York, N.Y)* 296, 1644-1646.
- Moore D. J., Chambers J. K., Murdock P. R. and Emson P. C. (2002) Human Ntera-2/D1 neuronal progenitor cells endogenously express a functional P2Y1 receptor. *Neuropharmacology* 43, 966-978.
- Mora A., Sabio G., Risco A. M., Cuenda A., Alonso J. C., Soler G. and Centeno F. (2002) Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cellular signalling* 14, 557-562.
- Moreschi I., Bruzzone S., Bodrato N., Usai C., Guida L., Nicholas R. A., Kassack M. U., Zocchi E. and De Flora A. (2008) NAADP+ is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor. *Cell calcium* 43, 344-355.
- Moreschi I., Bruzzone S., Nicholas R. A., Fruscione F., Sturla L., Benvenuto F., Usai C., Meis S., Kassack M. U., Zocchi E. and De Flora A. (2006) Extracellular NAD+ is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor in human granulocytes. *The Journal of biological chemistry* 281, 31419-31429.
- Morfini G., Szebenyi G., Elluru R., Ratner N. and Brady S. T. (2002) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *The EMBO journal* 21, 281-293.
- Morfini G., Szebenyi G., Brown H., Pant H. C., Pigino G., DeBoer S., Beffert U. and Brady S. T. (2004) A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *The EMBO journal* 23, 2235-2245.
- Mori M., Heuss C., Gahwiler B. H. and Gerber U. (2001) Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *The Journal of physiology* 535, 115-123.
- Moro S. and Jacobson K. A. (2002) Molecular modeling as a tool to investigate molecular recognition in P2Y receptors. *Current pharmaceutical design* 8, 2401-2413.
- Mueser K. T. and McGurk S. R. (2004) Schizophrenia. *Lancet* 363, 2063-2072.
- Mukai F., Ishiguro K., Sano Y. and Fujita S. C. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *Journal of neurochemistry* 81, 1073-1083.

- Mulholland D. J., Dedhar S., Wu H. and Nelson C. C. (2006) PTEN and GSK3 β : key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene* 25, 329-337.
- Mulryan K., Gitterman D. P., Lewis C. J., Vial C., Leckie B. J., Cobb A. L., Brown J. E., Conley E. C., Buell G., Pritchard C. A. and Evans R. J. (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403, 86-89.
- Munoz D. J., Thorne P. R. and Housley G. D. (1999) P2X receptor-mediated changes in cochlear potentials arising from exogenous adenosine 5'-triphosphate in endolymph. *Hearing research* 138, 56-64.
- Murai H., Okazaki M. and Kikuchi A. (1996) Tyrosine dephosphorylation of glycogen synthase kinase-3 is involved in its extracellular signal-dependent inactivation. *FEBS letters* 392, 153-160.
- Murgia M., Hanau S., Pizzo P., Rippa M. and Di Virgilio F. (1993) Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *The Journal of biological chemistry* 268, 8199-8203.
- Murrell-Lagnado R. D. and Qureshi O. S. (2008) Assembly and trafficking of P2X purinergic receptors (Review). *Molecular membrane biology* 25, 321-331.
- Nagaya N., Tittle R. K., Saar N., Dellal S. S. and Hume R. I. (2005) An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *The Journal of biological chemistry* 280, 25982-25993.
- Nagele R. G., D'Andrea M. R., Lee H., Venkataraman V. and Wang H. Y. (2003) Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* 971, 197-209.
- Naito A. T., Akazawa H., Takano H., Minamino T., Nagai T., Aburatani H. and Komuro I. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circulation research* 97, 144-151.
- Nakagawa T., Wakamatsu K., Maeda S., Shirakawa H. and Kaneko S. (2008) Differential contribution of spinal mitogen-activated protein kinases to the phase of long-lasting allodynia evoked by intrathecal administration of ATP in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31, 1164-1168.
- Nakamoto T., Brown D. A., Catalan M. A., Gonzalez-Begne M., Romanenko V. G. and Melvin J. E. (2009) Purinergic P2X7 receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland. *The Journal of biological chemistry* 284, 4815-4822.
- Nakazawa K. and Ohno Y. (1999) Neighboring glycine residues are essential for P2X2 receptor/channel function. *European journal of pharmacology* 370, R5-6.
- Nakazawa K., Fujimori K., Takanaka A. and Inoue K. (1991) Comparison of adenosine triphosphate- and nicotine-activated inward currents in rat pheochromocytoma cells. *The Journal of physiology* 434, 647-660.
- Nakazawa K., Inoue K., Koizumi S. and Inoue K. (1994) Facilitation by 5-hydroxytryptamine of ATP-activated current in rat pheochromocytoma cells. *Pflügers Arch* 427, 492-499.
- Nakazawa K., Yamakoshi Y., Tsuchiya T. and Ohno Y. (2005) Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *European journal of pharmacology* 518, 107-110.
- Nakazawa K., Ojima H., Ishii-Nozawa R., Takeuchi K. and Ohno Y. (2004) Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X2 receptor activation. *European journal of pharmacology* 483, 29-35.
- Nakazawa T., Tamai M. and Mori N. (2002) Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Investigative ophthalmology & visual science* 43, 3319-3326.
- Nawa G., Urano T., Tokino T., Ochi T. and Miyoshi Y. (1998) Cloning and characterization of the murine P2XM receptor gene. *Journal of human genetics* 43, 262-267.
- Neary J. T. (1996) Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors and underlying signal transduction mechanisms. *Ciba Foundation symposium* 198, 130-139; discussion 139-141.
- Neary J. T. and Zhu Q. (1994) Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport* 5, 1617-1620.
- Neary J. T. and Kang Y. (2006) P2 purinergic receptors signal to glycogen synthase kinase-3 β in astrocytes. *Journal of neuroscience research* 84, 515-524.
- Neary J. T., Whittemore S. R., Zhu Q. and Norenberg M. D. (1994) Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factors and extracellular ATP. *Journal of neurochemistry* 63, 490-494.
- Neary J. T., Kang Y., Shi Y. F., Tran M. D. and Wanner I. B. (2006) P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions. *Novartis Foundation symposium* 276, 131-143; discussion 143-137, 233-137, 275-181.
- Neary J. T., Kang Y., Bu Y., Yu E., Akong K. and Peters C. M. (1999) Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J Neurosci* 19, 4211-4220.
- Neri A., Marmioli S., Tassone P., Lombardi L., Nobili L., Verdelli D., Civallero M., Cosenza M., Bertacchini J., Federico M., De Pol A., Delilieri G.

- L. and Sacchi S. (2008) The oral protein-kinase C beta inhibitor enzastaurin (LY317615) suppresses signalling through the AKT pathway, inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Leukemia & lymphoma* 49, 1374-1383.
- Nestler E. J., Barrot M., DiLeone R. J., Eisch A. J., Gold S. J. and Monteggia L. M. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.
- Newgard C. B., Brady M. J., O'Doherty R. M. and Saltiel A. R. (2000) Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes* 49, 1967-1977.
- Nguyen T., Erb L., Weisman G. A., Marchese A., Heng H. H., Garrad R. C., George S. R., Turner J. T. and O'Dowd B. F. (1995) Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 270, 30845-30848.
- Nicke A. (2008) Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochemical and biophysical research communications* 377, 803-808.
- Nicke A., Kerschensteiner D. and Soto F. (2005) Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *Journal of neurochemistry* 92, 925-933.
- Nicke A., Baumert H. G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E. and Schmalzing G. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *The EMBO journal* 17, 3016-3028.
- Nicholas R. A., Watt W. C., Lazarowski E. R., Li Q. and Harden K. (1996a) Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Molecular pharmacology* 50, 224-229.
- Nicholas R. A., Lazarowski E. R., Watt W. C., Li Q., Boyer J. and Harden T. K. (1996b) Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors. *Journal of autonomic pharmacology* 16, 319-323.
- Nijhawan D., Honarpour N. and Wang X. (2000) Apoptosis in neural development and disease. *Annual review of neuroscience* 23, 73-87.
- Nikoulina S. E., Ciaraldi T. P., Mudaliar S., Mohideen P., Carter L. and Henry R. R. (2000) Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 263-271.
- Nishimoto S. and Nishida E. (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO reports* 7, 782-786.
- Noble W., Planel E., Zehr C., Olm V., Meyerson J., Suleman F., Gaynor K., Wang L., LaFrancois J., Feinstein B., Burns M., Krishnamurthy P., Wen Y., Bhat R., Lewis J., Dickson D. and Duff K. (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6990-6995.
- Noguchi K., Ishii S. and Shimizu T. (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *The Journal of biological chemistry* 278, 25600-25606.
- North R. A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82, 1013-1067.
- Novak A. and Dedhar S. (1999) Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci* 56, 523-537.
- O'Connor S. E., Dainty I. A. and Leff P. (1991) Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends in pharmacological sciences* 12, 137-141.
- Obersteiner H. (1880) Beitrage zur Kenntnis von feineren Bau der Kleinhirnrinde. *Sitzungsb. Kais. Akad. Wissench*, 101-114.
- Ohsawa K., Irino Y., Nakamura Y., Akazawa C., Inoue K. and Kohsaka S. (2007) Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 55, 604-616.
- Oriente F., Formisano P., Miele C., Fiory F., Maitan M. A., Vigliotta G., Trencia A., Santopietro S., Caruso M., Van Obberghen E. and Beguinot F. (2001) Insulin receptor substrate-2 phosphorylation is necessary for protein kinase C zeta activation by insulin in L6hIR cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 37109-37119.
- Ortega F., Perez-Sen R. and Miras-Portugal M. T. (2008) Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *Journal of neurochemistry* 104, 62-73.
- Ortega F., Perez-Sen R., Delicado, E.G., Miras-Portugal, MT (2009) P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *neurotoxicity research*.
- Otero M., Garrad R. C., Velazquez B., Hernandez-Perez M. G., Camden J. M., Erb L., Clarke L. L., Turner J. T., Weisman G. A. and Gonzalez F. A. (2000) Mechanisms of agonist-dependent and -independent desensitization of a recombinant P2Y2 nucleotide receptor. *Molecular and cellular biochemistry* 205, 115-123.
- Oury C., Toth-Zsomboki E., Vermeylen J. and Hoylaerts M. F. (2002) P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood* 100, 2499-2505.
- Palea S., Artibani W., Ostardo E., Trist D. G. and Pietra C. (1993) Evidence for purinergic neurotransmission in human urinary bladder affected by interstitial cystitis. *The Journal of urology* 150, 2007-2012.
- Palmer R. K., Boyer J. L., Schachter J. B., Nicholas R. A. and Harden T. K. (1998) Agonist action of

- adenosine triphosphates at the human P2Y₁ receptor. *Molecular pharmacology* 54, 1118-1123.
- Panenka W., Jijon H., Herx L. M., Armstrong J. N., Feighan D., Wei T., Yong V. W., Ransohoff R. M. and MacVicar B. A. (2001) P2X₇-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 21, 7135-7142.
- Pankratov Y., Castro E., Miras-Portugal M. T. and Krishtal O. (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 10, 3898-3902.
- Pankratov Y. V., Lalo U. V. and Krishtal O. A. (2002) Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci* 22, 8363-8369.
- Pap M. and Cooper G. M. (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *The Journal of biological chemistry* 273, 19929-19932.
- Pap M. and Cooper G. M. (2002) Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 22, 578-586.
- Papkoff J. and Aikawa M. (1998) WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 247, 851-858.
- Parandeh F., Abaraviciene S. M., Amisten S., Erlinge D. and Salehi A. (2008) Uridine diphosphate (UDP) stimulates insulin secretion by activation of P2Y₆ receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 370, 499-503.
- Park B. C., Kido Y. and Accili D. (1999) Differential signaling of insulin and IGF-1 receptors to glycogen synthesis in murine hepatocytes. *Biochemistry* 38, 7517-7523.
- Parr C. E., Sullivan D. M., Paradiso A. M., Lazarowski E. R., Burch L. H., Olsen J. C., Erb L., Weisman G. A., Boucher R. C. and Turner J. T. (1994) Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3275-3279.
- Parvathenani L. K., Tertyshnikova S., Greco C. R., Roberts S. B., Robertson B. and Posmantur R. (2003) P2X₇ mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* 278, 13309-13317.
- Pastor-Anglada M., Felipe A. and Casado F. J. (1998) Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends in pharmacological sciences* 19, 424-430.
- Patapoutian A. and Reichardt L. F. (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current opinion in neurobiology* 11, 272-280.
- Paukert M., Osteroth R., Geisler H. S., Brandle U., Glowatzki E., Ruppersberg J. P. and Grunder S. (2001) Inflammatory mediators potentiate ATP-gated channels through the P2X(3) subunit. *The Journal of biological chemistry* 276, 21077-21082.
- Pearce N. J., Arch J. R., Clapham J. C., Coghlan M. P., Corcoran S. L., Lister C. A., Llano A., Moore G. B., Murphy G. J., Smith S. A., Taylor C. M., Yates J. W., Morrison A. D., Harper A. J., Roxbee-Cox L., Abuin A., Wargent E. and Holder J. C. (2004) Development of glucose intolerance in male transgenic mice overexpressing human glycogen synthase kinase-3beta on a muscle-specific promoter. *Metabolism: clinical and experimental* 53, 1322-1330.
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K. and Cobb M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153-183.
- Pei J. J., Tanaka T., Tung Y. C., Braak E., Iqbal K. and Grundke-Iqbal I. (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56, 70-78.
- Pendergast W., Yerxa B. R., Douglass J. G., 3rd, Shaver S. R., Dougherty R. W., Redick C. C., Sims I. F. and Rideout J. L. (2001) Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11, 157-160.
- Peter M. E. and Krammer P. H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation* 10, 26-35.
- Phiel C. J. and Klein P. S. (2001) Molecular targets of lithium action. *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, 789-813.
- Phiel C. J., Wilson C. A., Lee V. M. and Klein P. S. (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423, 435-439.
- Pinson K. I., Brennan J., Monkley S., Avery B. J. and Skarnes W. C. (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-538.
- Pintor J., Torres M. and Miras-Portugal M. T. (1991) Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life sciences* 48, 2317-2324.
- Pintor J., Rotllan P., Torres M. and Miras-Portugal M. T. (1992) Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Analytical biochemistry* 200, 296-300.
- Pintor J., Porras A., Mora F. and Miras-Portugal M. T.

- (1993) Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from caudate putamen of conscious rat. *Neuroscience letters* 150, 13-16.
- Pintor J., Sanchez-Nogueiro J., Irazu M., Mediero A., Pelaez T. and Peral A. (2004) Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. *Purinergic signalling* 1, 83-90.
- Pintor J., Miras-Portugal, M- T. (1993) Diadenosine polyphosphates -ApxA- as new neurotransmitters. *Drug Develop. Res.* 259-262.
- Pintor J. K., H.J.; Torres, M.; Miras-Portugal, M.T.; Zimmermann, H (1992) Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the Torpedo electric organ. *Neurosci. Res. Commun* 10, 9-15.
- Piroton S., Communi D., Motte S., Janssens R. and Boeynaems J. M. (1996) Endothelial P2-purinoceptors: subtypes and signal transduction. *Journal of autonomic pharmacology* 16, 353-356.
- Placido R., Auricchio G., Falzoni S., Battistini L., Colizzi V., Brunetti E., Di Virgilio F. and Mancino G. (2006) P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis reducing the intracellular bacterial viability. *Cellular immunology* 244, 10-18.
- Planel E., Miyasaka T., Launey T., Chui D. H., Tanemura K., Sato S., Murayama O., Ishiguro K., Tatebayashi Y. and Takashima A. (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 2401-2411.
- Plotkin B., Kaidanovich O., Talior I. and Eldar-Finkelman H. (2003) Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 305, 974-980.
- Plyte S. E., Hughes K., Nikolakaki E., Pulverer B. J. and Woodgett J. R. (1992) Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochimica et biophysica acta* 1114, 147-162.
- Pochet S., Garcia-Marcos M., Seil M., Otto A., Marino A. and Dehaye J. P. (2007) Contribution of two ionotropic purinergic receptors to ATP responses in submandibular gland ductal cells. *Cellular signalling* 19, 2155-2164.
- Polakis P. (1999) The oncogenic activation of beta-catenin. *Current opinion in genetics & development* 9, 15-21.
- Pons S., Trejo J. L., Martinez-Morales J. R. and Marti E. (2001) Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development (Cambridge, England)* 128, 1481-1492.
- Price M. A. and Kalderon D. (2002) Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* 108, 823-835.
- Quevedo C., Alcazar A. and Salinas M. (2000) Two different signal transduction pathways are implicated in the regulation of initiation factor 2B activity in insulin-like growth factor-1-stimulated neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 19192-19197.
- Ralevic V. and Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews* 50, 413-492.
- Ramon y Cajal S. (1911) Histology du system nerveux de l'homme et vertebres, Vol 2. Paris: Maloine.
- Ramon y Cajal S. (1960) Studies on vertebrate neurogenesis. *Springfield: Thomas*.
- Rao R., Hao C. M. and Breyer M. D. (2004) Hypertonic stress activates glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of renal medullary interstitial cells, suppressing an NFkappaB-driven cyclooxygenase-2-dependent survival pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 3949-3955.
- Rathbone M. P., Middlemiss P. J., Gysbers J. W., DeForge S., Costello P. and Del Maestro R. F. (1992) Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A, 529-536.
- Ren J., Bian X., DeVries M., Schnegelsberg B., Cockayne D. A., Ford A. P. and Galligan J. J. (2003) P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *The Journal of physiology* 552, 809-821.
- Resende R. R., Britto L. R. and Ulrich H. (2008) Pharmacological properties of purinergic receptors and their effects on proliferation and induction of neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Neurosci* 26, 763-777.
- Resendiz J. C., Kroll M. H. and Lassila R. (2007) Protease-activated receptor-induced Akt activation--regulation and possible function. *J Thromb Haemost* 5, 2484-2493.
- Rettinger J. and Schmalzing G. (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations. *The Journal of general physiology* 121, 451-461.
- Rettinger J., Aschrafi A. and Schmalzing G. (2000) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *The Journal of biological chemistry* 275, 33542-33547.
- Richardson P. J. and Brown S. J. (1987) ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *Journal of neurochemistry* 48, 622-630.
- Robaye B., Ghanem E., Wilkin F., Fokan D., Van Driessche W., Schurmans S., Boeynaems J. M. and Beauwens R. (2003) Loss of nucleotide regulation

- of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y4-null mice. *Molecular pharmacology* 63, 777-783.
- Roberts J. A. and Evans R. J. (2004) ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *The Journal of biological chemistry* 279, 9043-9055.
- Roberts J. A. and Evans R. J. (2007) Cysteine substitution mutants give structural insight and identify ATP binding and activation sites at P2X receptors. *J Neurosci* 27, 4072-4082.
- Roberts J. A., Vial C., Digby H. R., Agboh K. C., Wen H., Atterbury-Thomas A. and Evans R. J. (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflügers Arch* 452, 486-500.
- Robertson G., Bilenky M., Lin K., He A., Yuen W., Dagpinar M., Varhol R., Teague K., Griffith O. L., Zhang X., Pan Y., Hassel M., Sleumer M. C., Pan W., Pleasance E. D., Chuang M., Hao H., Li Y. Y., Robertson N., Fjell C., Li B., Montgomery S. B., Astakhova T., Zhou J., Sander J., Siddiqui A. S. and Jones S. J. (2006) cisRED: a database system for genome-scale computational discovery of regulatory elements. *Nucleic acids research* 34, D68-73.
- Robson S. C., Seivigny J. and Zimmermann H. (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling* 2, 409-430.
- Rodrigues R. J., Almeida T., Richardson P. J., Oliveira C. R. and Cunha R. A. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci* 25, 6286-6295.
- Rodriguez del Castillo A., Torres M., Delicado E. G. and Miras-Portugal M. T. (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *Journal of neurochemistry* 51, 1696-1703.
- Roh M. S., Eom T. Y., Zmijewska A. A., De Sarno P., Roth K. A. and Jope R. S. (2005) Hypoxia activates glycogen synthase kinase-3 in mouse brain in vivo: protection by mood stabilizers and imipramine. *Biological psychiatry* 57, 278-286.
- Rojo A. I., Rada P., Egea J., Rosa A. O., Lopez M. G. and Cuadrado A. (2008) Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Molecular and cellular neurosciences* 39, 125-132.
- Rolf M. G., Brearley C. A. and Mahaut-Smith M. P. (2001) Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thrombosis and haemostasis* 85, 303-308.
- Rong W., Gourine A. V., Cockayne D. A., Xiang Z., Ford A. P., Spyer K. M. and Burnstock G. (2003) Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci* 23, 11315-11321.
- Roper S. D. (2007) Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflügers Arch* 454, 759-776.
- Royle S. J., Bobanovic L. K. and Murrell-Lagnado R. D. (2002) Identification of a non-canonical tyrosine-based endocytic motif in an ionotropic receptor. *The Journal of biological chemistry* 277, 35378-35385.
- Ruan H. Z. and Burnstock G. (2005) The distribution of P2X5 purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell and tissue research* 319, 191-200.
- Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S. and Polakis P. (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science (New York, N.Y)* 272, 1023-1026.
- Rubio M. E. and Soto F. (2001) Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21, 641-653.
- Ruel L., Rodriguez R., Gallet A., Lavenant-Staccini L. and Therond P. P. (2003) Stability and association of Smoothed, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nature cell biology* 5, 907-913.
- Ryan K. A. and Pimplikar S. W. (2005) Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *The Journal of cell biology* 171, 327-335.
- Rylatt D. B., Aitken A., Bilham T., Condon G. D., Embi N. and Cohen P. (1980) Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *European journal of biochemistry / FEBS* 107, 529-537.
- Saito Y., Vandenheede J. R. and Cohen P. (1994) The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *The Biochemical journal* 303 (Pt 1), 27-31.
- Sak K. and Webb T. E. (2002) A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Archives of biochemistry and biophysics* 397, 131-136.
- Salter M. W., De Koninck Y. and Henry J. L. (1993) Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Progress in neurobiology* 41, 125-156.
- Samuels Y. and Ericson K. (2006) Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Current opinion in oncology* 18, 77-82.
- Sanchez-Nogueiro J., Marin-Garcia P. and Miras-Portugal M. T. (2005) Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule

- neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS letters* 579, 3783-3788.
- Sastry P. S. and Rao K. S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *Journal of neurochemistry* 74, 1-20.
- Saunders B. M., Fernando S. L., Sluyter R., Britton W. J. and Wiley J. S. (2003) A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of mycobacteria. *J Immunol* 171, 5442-5446.
- Savi P. and Herbert J. M. (2005) Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31, 174-183.
- Savi P., Beauverger P., Labouret C., Delfaud M., Salel V., Kaghad M. and Herbert J. M. (1998) Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS letters* 422, 291-295.
- Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A. and Moriyama Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5683-5686.
- Sawynok J., Downie J. W., Reid A. R., Cahill C. M. and White T. D. (1993) ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res* 610, 32-38.
- Sayas C. L., Avila J. and Wandosell F. (2002) Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms. *J Neurosci* 22, 6863-6875.
- Schachter J. B., Li Q., Boyer J. L., Nicholas R. A. and Harden T. K. (1996) Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1-purinoceptor. *British journal of pharmacology* 118, 167-173.
- Schmahmann J. D. (2004) Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 16, 367-378.
- Schnurr M., Toy T., Stoitzner P., Cameron P., Shin A., Beecroft T., Davis I. D., Cebon J. and Maraskovsky E. (2003) ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling. *Blood* 102, 613-620.
- Schoneberg T., Schulz A., Grosse R., Schade R., Henklein P., Schultz G. and Gudermann T. (1999) A novel subgroup of class I G-protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1446, 57-70.
- Schoneberg T., Hermsdorf T., Engemaier E., Engel K., Liebscher I., Thor D., Zierau K., Rompler H. and Schulz A. (2007) Structural and functional evolution of the P2Y(12)-like receptor group. *Purinergic signalling* 3, 255-268.
- Schubert M., Gautam D., Surjo D., Ueki K., Baudler S., Schubert D., Kondo T., Alber J., Galldiks N., Kustermann E., Arndt S., Jacobs A. H., Krone W., Kahn C. R. and Bruning J. C. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3100-3105.
- Schulman E. S., Glaum M. C., Post T., Wang Y., Raible D. G., Mohanty J., Butterfield J. H. and Pelleg A. (1999) ATP modulates anti-IgE-induced release of histamine from human lung mast cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20, 530-537.
- Schulze-Lohoff E., Hugo C., Rost S., Arnold S., Gruber A., Brune B. and Sterzel R. B. (1998) Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *The American journal of physiology* 275, F962-971.
- Schwartz P. M., Borghesani P. R., Levy R. L., Pomeroy S. L. and Segal R. A. (1997) Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF-/- mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19, 269-281.
- See V., Boutilier A. L., Bito H. and Loeffler J. P. (2001) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Faseb J* 15, 134-144.
- Seguela P., Haghighi A., Soghomonian J. J. and Cooper E. (1996) A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci* 16, 448-455.
- Sellers L. A., Simon J., Lundahl T. S., Cousens D. J., Humphrey P. P. and Barnard E. A. (2001) Adenosine nucleotides acting at the human P2Y1 receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 16379-16390.
- Sellick G. S., Rudd M., Eve P., Allinson R., Matutes E., Catovsky D. and Houlston R. S. (2004) The P2X7 receptor gene A1513C polymorphism does not contribute to risk of familial or sporadic chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1065-1067.
- Sen R. P., Delicado E. G. and Miras-Portugal M. T. (1999) Differential modulation of nucleoside transport types in neuroblastoma cells by protein kinase activation. *Neuropharmacology* 38, 1009-1015.
- Seye C. I., Yu N., Gonzalez F. A., Erb L. and Weisman G. A. (2004) The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *The Journal of biological chemistry* 279, 35679-35686.
- Shakoori A., Ougolkov A., Yu Z. W., Zhang B.,

- Modarressi M. H., Billadeau D. D., Mai M., Takahashi Y. and Minamoto T. (2005) Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochemical and biophysical research communications* 334, 1365-1373.
- Shao J., Jung C., Liu C. and Sheng H. (2005) Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer. *The Journal of biological chemistry* 280, 26565-26572.
- Shaver S. R. (2001) P2Y receptors: biological advances and therapeutic opportunities. *Current opinion in drug discovery & development* 4, 665-670.
- Shaw M. and Cohen P. (1999) Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells. *FEBS letters* 461, 120-124.
- Shaw M., Cohen P. and Alessi D. R. (1997) Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS letters* 416, 307-311.
- Shaw M., Cohen P. and Alessi D. R. (1998) The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *The Biochemical journal* 336 (Pt 1), 241-246.
- Shemon A. N., Sluyter R., Fernando S. L., Clarke A. L., Dao-Ung L. P., Skarratt K. K., Saunders B. M., Tan K. S., Gu B. J., Fuller S. J., Britton W. J., Petrou S. and Wiley J. S. (2006) A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X₇ function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *The Journal of biological chemistry* 281, 2079-2086.
- Shen J. and DiCorleto P. E. (2008) ADP stimulates human endothelial cell migration via P2Y₁ nucleotide receptor-mediated mitogen-activated protein kinase pathways. *Circulation research* 102, 448-456.
- Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. and et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shi S. H., Cheng T., Jan L. Y. and Jan Y. N. (2004) APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14, 2025-2032.
- Shigetomi E. and Kato F. (2004) Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* 24, 3125-3135.
- Shin S. Y., Kim C. G., Jho E. H., Rho M. S., Kim Y. S., Kim Y. H. and Lee Y. H. (2004) Hydrogen peroxide negatively modulates Wnt signaling through downregulation of beta-catenin. *Cancer letters* 212, 225-231.
- Shinozaki Y., Koizumi S., Ohno Y., Nagao T. and Inoue K. (2006) Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes. *Glia* 54, 606-618.
- Sichardt K. and Nieber K. (2007) Adenosine A(1) receptor: Functional receptor-receptor interactions in the brain. *Purinergic signalling* 3, 285-298.
- Silberstein F. C., De Simone R., Levi G. and Aloisi F. (1996) Cytokine-regulated expression of platelet-derived growth factor gene and protein in cultured human astrocytes. *Journal of neurochemistry* 66, 1409-1417.
- Sim J. A., Chaumont S., Jo J., Ulmann L., Young M. T., Cho K., Buell G., North R. A. and Rassendren F. (2006) Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X₄ knock-out mice. *J Neurosci* 26, 9006-9009.
- Simon J., Kidd E. J., Smith F. M., Chessell I. P., Murrell-Lagnado R., Humphrey P. P. and Barnard E. A. (1997) Localization and functional expression of splice variants of the P2X₂ receptor. *Molecular pharmacology* 52, 237-248.
- Simon J., Filippov A. K., Goransson S., Wong Y. H., Frelin C., Michel A. D., Brown D. A. and Barnard E. A. (2002) Characterization and channel coupling of the P2Y₁₂ nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 31390-31400.
- Simon R. (2005) Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J Clin Oncol* 23, 7332-7341.
- Singer C. A., Figueroa-Masot X. A., Batchelor R. H. and Dorsa D. M. (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 19, 2455-2463.
- Smith S. A., Porter L. E., Biswas N. and Freed M. I. (2004) Rosiglitazone, but not glyburide, reduces circulating proinsulin and the proinsulin:insulin ratio in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 6048-6053.
- Solini A., Chiozzi P., Morelli A., Passaro A., Fellin R. and Di Virgilio F. (2003) Defective P2Y purinergic receptor function: A possible novel mechanism for impaired glucose transport. *Journal of cellular physiology* 197, 435-444.
- Solini A., Iacobini C., Ricci C., Chiozzi P., Amadio L., Pricci F., Di Mario U., Di Virgilio F. and Pugliese G. (2005) Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: role in diabetic and other glomerular diseases. *Kidney international* 67, 875-885.
- Solsona C. B., L.; Aleu, J.; Elias, M.; Martín-Satue, M.; Marsal, J.; Blasi, J. (2004) Endogenous hemichannels and ATP release in *Xenopus* oocytes.

- 4th International symposium of nucleosides and nucleotides. Chapel Hill.
- Sonin D., Zhou S. Y., Cronin C., Sonina T., Wu J., Jacobson K. A., Pappano A. and Liang B. T. (2008) Role of P2X purinergic receptors in the rescue of ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H1191-H1197.
- Soto F., Garcia-Guzman M., Karschin C. and Stuhmer W. (1996a) Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochemical and biophysical research communications* 223, 456-460.
- Soto F., Garcia-Guzman M., Gomez-Hernandez J. M., Hollmann M., Karschin C. and Stuhmer W. (1996b) P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3684-3688.
- Sperlagh B., Heinrich A. and Csölle C. (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic signalling* 3, 269-284.
- Sperlagh B., Vizi E. S., Wirkner K. and Illes P. (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in neurobiology* 78, 327-346.
- Sperlagh B., Kofalvi A., Deuchars J., Atkinson L., Milligan C. J., Buckley N. J. and Vizi E. S. (2002) Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 81, 1196-1211.
- Spychala J. and Kitajewski J. (2004) Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Experimental cell research* 296, 99-108.
- Spyer K. M., Dale N. and Gourine A. V. (2004) ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Experimental physiology* 89, 53-59.
- Stambolic V. and Woodgett J. R. (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *The Biochemical journal* 303 (Pt 3), 701-704.
- Stambolic V., Ruel L. and Woodgett J. R. (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6, 1664-1668.
- Stefan C., Jansen S. and Bollen M. (2006) Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic signalling* 2, 361-370.
- Steinberg T. H. and Hiken J. F. (2007) P2 receptors in macrophage fusion and osteoclast formation. *Purinergic signalling* 3, 53-57.
- Steinbrecher K. A., Wilson W., 3rd, Cogswell P. C. and Baldwin A. S. (2005) Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. *Molecular and cellular biology* 25, 8444-8455.
- Stojilkovic S. S., Tomic M., He M. L., Yan Z., Koshimizu T. A. and Zemkova H. (2005) Molecular dissection of purinergic P2X receptor channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1048, 116-130.
- Storey R. F. (2006) Biology and pharmacology of the platelet P2Y12 receptor. *Current pharmaceutical design* 12, 1255-1259.
- Su Y., Ryder J., Li B., Wu X., Fox N., Solenberg P., Brune K., Paul S., Zhou Y., Liu F. and Ni B. (2004) Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry* 43, 6899-6908.
- Subramaniam S., Strelau J. and Unsicker K. (2003) Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *The Journal of biological chemistry* 278, 8904-8912.
- Subramaniam S., Zirrgiebel U., von Bohlen Und Halbach O., Strelau J., Laliberte C., Kaplan D. R. and Unsicker K. (2004) ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3. *The Journal of cell biology* 165, 357-369.
- Subramaniam S., Shahani N., Strelau J., Laliberte C., Brandt R., Kaplan D. and Unsicker K. (2005) Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci* 25, 2838-2852.
- Sun S. H., Lin L. B., Hung A. C. and Kuo J. S. (1999) ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. *Journal of neurochemistry* 73, 334-343.
- Surprenant A., Buell G. and North R. A. (1995) P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends in neurosciences* 18, 224-229.
- Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E., North R. A. and Buell G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science (New York, N.Y)* 272, 735-738.
- Surprenant A. N. R. (2008) Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu Rev Physiol*.
- Sutherland C. and Cohen P. (1994) The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS letters* 338, 37-42.
- Sutherland C., Leighton I. A. and Cohen P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *The Biochemical journal* 296 (Pt 1), 15-19.
- Swanson K. D., Reigh C. and Landreth G. E. (1998) ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic

- P2X2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *The Journal of biological chemistry* 273, 19965-19971.
- Tabata K., Baba K., Shiraishi A., Ito M. and Fujita N. (2007) The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 363, 861-866.
- Takadera T. and Ohyashiki T. (2004) Glycogen synthase kinase-3 inhibitors prevent caspase-dependent apoptosis induced by ethanol in cultured rat cortical neurons. *European journal of pharmacology* 499, 239-245.
- Takashima A., Noguchi K., Michel G., Mercken M., Hoshi M., Ishiguro K. and Imahori K. (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neuroscience letters* 203, 33-36.
- Takashima A., Murayama M., Murayama O., Kohno T., Honda T., Yasutake K., Nihonmatsu N., Mercken M., Yamaguchi H., Sugihara S. and Wolozin B. (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9637-9641.
- Tamai K., Semenov M., Kato Y., Spokony R., Liu C., Katsuyama Y., Hess F., Saint-Jeannet J. P. and He X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535.
- Tamminga C. A. and Holcomb H. H. (2005) Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Molecular psychiatry* 10, 27-39.
- Tan J., Geng L., Yazlovitskaya E. M. and Hallahan D. E. (2006) Protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in irradiated vascular endothelium. *Cancer research* 66, 2320-2327.
- Tan J., Zhuang L., Leong H. S., Iyer N. G., Liu E. T. and Yu Q. (2005) Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3beta promotes p53-dependent apoptosis through a direct Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. *Cancer research* 65, 9012-9020.
- Tandon R. (1999) Cholinergic aspects of schizophrenia. *The British journal of psychiatry*, 7-11.
- Tanner N. K., Cordin O., Banroques J., Doere M. and Linder P. (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Molecular cell* 11, 127-138.
- Tarraga J., Medina I., Carbonell J., Huerta-Cepas J., Minguéz P., Alloza E., Al-Shahrour F., Vegas-Azcarate S., Goetz S., Escobar P., Garcia-Garcia F., Conesa A., Montaner D. and Dopazo J. (2008) GEPAS, a web-based tool for microarray data analysis and interpretation. *Nucleic acids research* 36, W308-314.
- Tauber J., Davitt W. F., Bokosky J. E., Nichols K. K., Yerxa B. R., Schaberg A. E., LaVange L. M., Mills-Wilson M. C. and Kellerman D. J. (2004) Double-masked, placebo-controlled safety and efficacy trial of diquafosol tetrasodium (INS365) ophthalmic solution for the treatment of dry eye. *Cornea* 23, 784-792.
- Taurin S., Hogarth K., Sandbo N., Yau D. M. and Dulin N. O. (2007) Gbetagamma-mediated prostacyclin production and cAMP-dependent protein kinase activation by endothelin-1 promotes vascular smooth muscle cell hypertrophy through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *The Journal of biological chemistry* 282, 19518-19525.
- Thomas G. M., Frame S., Goedert M., Nathke I., Polakis P. and Cohen P. (1999) A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS letters* 458, 247-251.
- Thomas S., Virginio C., North R. A. and Surprenant A. (1998) The antagonist trinitrophenyl-ATP reveals co-existence of distinct P2X receptor channels in rat nodose neurones. *The Journal of physiology* 509 (Pt 2), 411-417.
- Todorov L. D., Mihaylova-Todorova S., Westfall T. D., Sneddon P., Kennedy C., Bjur R. A. and Westfall D. P. (1997) Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387, 76-79.
- Tokumura A., Majima E., Kariya Y., Tominaga K., Kogure K., Yasuda K. and Fukuzawa K. (2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* 277, 39436-39442.
- Tokuyama Y., Hara M., Jones E. M., Fan Z. and Bell G. I. (1995) Cloning of rat and mouse P2Y purinoreceptors. *Biochemical and biophysical research communications* 211, 211-218.
- Tonazzini I., Trincavelli M. L., Montali M. and Martini C. (2008) Regulation of A1 adenosine receptor functioning induced by P2Y1 purinergic receptor activation in human astroglial cells. *Journal of neuroscience research* 86, 2857-2866.
- Tong N., Sanchez J. F., Maggirwar S. B., Ramirez S. H., Guo H., Dewhurst S. and Gelbard H. A. (2001) Activation of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) by platelet activating factor mediates migration and cell death in cerebellar granule neurons. *The European journal of neuroscience* 13, 1913-1922.
- Torres B., Zambon A. C. and Insel P. A. (2002) P2Y11 receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells. A mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *The*

- Journal of biological chemistry* 277, 7761-7765.
- Torres G. E., Egan T. M. and Voigt M. M. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *The Journal of biological chemistry* 274, 6653-6659.
- Torres G. E., Haines W. R., Egan T. M. and Voigt M. M. (1998) Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Molecular pharmacology* 54, 989-993.
- Toth-Zsamboki E., Oury C., Watanabe H., Nilius B., Vermynen J. and Hoylaerts M. F. (2002) The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function. *FEBS letters* 524, 15-19.
- Townsend-Nicholson A., King B. F., Wildman S. S. and Burnstock G. (1999) Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X4 and P2X4a receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 64, 246-254.
- Tozaki-Saitoh H., Tsuda M., Miyata H., Ueda K., Kohsaka S. and Inoue K. (2008) P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 28, 4949-4956.
- Trumel C., Payraastre B., Plantavid M., Hechler B., Viala C., Presek P., Martinson E. A., Cazenave J. P., Chap H. and Gachet C. (1999) A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 94, 4156-4165.
- Tsuda M., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Mizokoshi A., Kohsaka S., Salter M. W. and Inoue K. (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783.
- Tsujio I., Tanaka T., Kudo T., Nishikawa T., Shinozaki K., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. and Takeda M. (2000) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C delta: implications for regulation of tau phosphorylation. *FEBS letters* 469, 111-117.
- Tu M. T., Luo S. F., Wang C. C., Chien C. S., Chiu C. T., Lin C. C. and Yang C. M. (2000) P2Y(2) receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *British journal of pharmacology* 129, 1481-1489.
- Turner J. T., Landon L. A., Gibbons S. J. and Talamo B. R. (1999) Salivary gland P2 nucleotide receptors. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 210-224.
- Ullmann H., Meis S., Hongwiset D., Marzian C., Wiese M., Nickel P., Communi D., Boeynaems J. M., Wolf C., Hausmann R., Schmalzing G. and Kassack M. U. (2005) Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency. *Journal of medicinal chemistry* 48, 7040-7048.
- Umez-Goto M., Kishi Y., Taira A., Hama K., Dohmae N., Takio K., Yamori T., Mills G. B., Inoue K., Aoki J. and Arai H. (2002) Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *The Journal of cell biology* 158, 227-233.
- Urano T., Nishimori H., Han H., Furuhashi T., Kimura Y., Nakamura Y. and Tokino T. (1997) Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53. *Cancer research* 57, 3281-3287.
- Valera S., Hussy N., Evans R. J., Adami N., North R. A., Surprenant A. and Buell G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-519.
- van Amerongen R., van der Gulden H., Bleeker F., Jonkers J. and Berns A. (2004) Characterization and functional analysis of the murine Frat2 gene. *The Journal of biological chemistry* 279, 26967-26974.
- Van Kolen K. and Slegers H. (2004) P2Y12 receptor stimulation inhibits beta-adrenergic receptor-induced differentiation by reversing the cyclic AMP-dependent inhibition of protein kinase B. *Journal of neurochemistry* 89, 442-453.
- Van Kolen K. and Slegers H. (2006) Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signalling networks. *Purinergic signalling* 2, 451-469.
- Van Kolen K., Gilany K., Moens L., Esmans E. L. and Slegers H. (2006) P2Y12 receptor signalling towards PKB proceeds through IGF-I receptor cross-talk and requires activation of Src, Pyk2 and Rap1. *Cellular signalling* 18, 1169-1181.
- van Weeren P. C., de Bruyn K. M., de Vries-Smits A. M., van Lint J. and Burgering B. M. (1998) Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *The Journal of biological chemistry* 273, 13150-13156.
- Vassilatis D. K., Hohmann J. G., Zeng H., Li F., Ranchalis J. E., Mortrud M. T., Brown A., Rodriguez S. S., Weller J. R., Wright A. C., Bergmann J. E. and Gaitanaris G. A. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4903-4908.
- Vaudry D., Stork P. J., Lazarovici P. and Eiden L. E. (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science (New York, N.Y.)* 296, 1648-1649.
- Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Pamantung T. F., Fournier A. and Vaudry H. (2000) PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 293-299.
- Veggetti M., Muchnik S. and Losavio A. (2008) Effect of purines on calcium-independent acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience* 154, 1324-1336.

- Vial C. and Evans R. J. (2002) P2X(1) receptor-deficient mice establish the native P2X receptor and a P2Y6-like receptor in arteries. *Molecular pharmacology* 62, 1438-1445.
- Vial C., Roberts J. A. and Evans R. J. (2004a) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends in pharmacological sciences* 25, 487-493.
- Vial C., Tobin A. B. and Evans R. J. (2004b) G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *The Biochemical journal* 382, 101-110.
- Viatour P., Dejadin E., Warnier M., Lair F., Claudio E., Bureau F., Marine J. C., Merville M. P., Maurer U., Green D., Piette J., Siebenlist U., Bours V. and Chariot A. (2004) GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Molecular cell* 16, 35-45.
- Virginio C., North R. A. and Surprenant A. (1998a) Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *The Journal of physiology* 510 (Pt 1), 27-35.
- Virginio C., Church D., North R. A. and Surprenant A. (1997) Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36, 1285-1294.
- Virginio C., Robertson G., Surprenant A. and North R. A. (1998b) Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Molecular pharmacology* 53, 969-973.
- Virginio C., MacKenzie A., North R. A. and Surprenant A. (1999) Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *The Journal of physiology* 519 Pt 2, 335-346.
- Volonte C. and D'Ambrosi N. (2009) Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *The FEBS journal* 276, 318-329.
- Volonte C., Amadio S., D'Ambrosi N., Colpi M. and Burnstock G. (2006) P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacology & therapeutics* 112, 264-280.
- Volonte C., Amadio S., Cavaliere F., D'Ambrosi N., Vacca F. and Bernardi G. (2003) Extracellular ATP and neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2, 403-412.
- Volterra A. and Meldolesi J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6, 626-640.
- von Kugelgen I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & therapeutics* 110, 415-432.
- von Kugelgen I. and Starke K. (1991) Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 344, 419-429.
- von Kugelgen I. and Wetter A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362, 310-323.
- Waldo G. L. and Harden T. K. (2004) Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Molecular pharmacology* 65, 426-436.
- Wang C. X., Song J. H., Song D. K., Yong V. W., Shuaib A. and Hao C. (2006a) Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2. *Cell death and differentiation* 13, 1203-1212.
- Wang C. Z., Namba N., Gonoi T., Inagaki N. and Seino S. (1996) Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 220, 196-202.
- Wang L., Olivecrona G., Gotberg M., Olsson M. L., Winzell M. S. and Erlinge D. (2005) ADP acting on P2Y13 receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells. *Circulation research* 96, 189-196.
- Wang Q., Zhou Y. and Evers B. M. (2006b) Neurotensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells. *Neoplasia (New York, N.Y)* 8, 781-787.
- Wang Q. M., Fiol C. J., DePaoli-Roach A. A. and Roach P. J. (1994) Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 269, 14566-14574.
- Wang X., Arcuino G., Takano T., Lin J., Peng W. G., Wan P., Li P., Xu Q., Liu Q. S., Goldman S. A. and Nedergaard M. (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nature medicine* 10, 821-827.
- Warny M., Aboudola S., Robson S. C., Seigny J., Communi D., Soltoff S. P. and Kelly C. P. (2001) P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *The Journal of biological chemistry* 276, 26051-26056.
- Watcharasi P., Bijur G. N., Song L., Zhu J., Chen X. and Jope R. S. (2003) Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *The Journal of biological chemistry* 278, 48872-48879.
- Watcharasi P., Bijur G. N., Zmijewski J. W., Song L., Zmijewska A., Chen X., Johnson G. V. and Jope R. S. (2002) Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7951-

- 7955.
- Watts D. T. (1953) Stimulation of uterine muscle by adenosine triphosphate. *The American journal of physiology* 173, 291-296.
- Webb T. E., Henderson D. J., Roberts J. A. and Barnard E. A. (1998) Molecular cloning and characterization of the rat P2Y₄ receptor. *Journal of neurochemistry* 71, 1348-1357.
- Webb T. E., Simon J., Krishek B. J., Bateson A. N., Smart T. G., King B. F., Burnstock G. and Barnard E. A. (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS letters* 324, 219-225.
- Webb T. E., Henderson D., King B. F., Wang S., Simon J., Bateson A. N., Burnstock G. and Barnard E. A. (1996) A novel G protein-coupled P₂ purinoceptor (P2Y₃) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Molecular pharmacology* 50, 258-265.
- Wehrli M., Dougan S. T., Caldwell K., O'Keefe L., Schwartz S., Vaizel-Ohayon D., Schejter E., Tomlinson A. and DiNardo S. (2000) arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527-530.
- Wei H., Leeds P. R., Qian Y., Wei W., Chen R. and Chuang D. (2000) beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *European journal of pharmacology* 392, 117-123.
- Weisman G. A., Wang M., Kong Q., Chorna N. E., Neary J. T., Sun G. Y., Gonzalez F. A., Seye C. I. and Erb L. (2005) Molecular determinants of P2Y₂ nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Molecular neurobiology* 31, 169-183.
- Wen L. T. and Knowles A. F. (2003) Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A₃ adenosine receptor. *British journal of pharmacology* 140, 1009-1018.
- Westfall D. P., Shinozuka K., Forsyth K. M. and Bjur R. A. (1990) Presynaptic purine receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 604, 130-135.
- White P. J., Webb T. E. and Boarder M. R. (2003) Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Molecular pharmacology* 63, 1356-1363.
- Widmann C., Gibson S., Jarpe M. B. and Johnson G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* 79, 143-180.
- Wiedmann M., Wang X., Tang X., Han M., Li M. and Mao Z. (2005) PI3K/Akt-dependent regulation of the transcription factor myocyte enhancer factor-2 in insulin-like growth factor-1- and membrane depolarization-mediated survival of cerebellar granule neurons. *Journal of neuroscience research* 81, 226-234.
- Wildman S. S., King B. F. and Burnstock G. (1998) Zn²⁺ modulation of ATP-responses at recombinant P2X₂ receptors and its dependence on extracellular pH. *British journal of pharmacology* 123, 1214-1220.
- Wildman S. S., Brown S. G., Rahman M., Noel C. A., Churchill L., Burnstock G., Unwin R. J. and King B. F. (2002) Sensitization by extracellular Ca²⁺ of rat P2X₅ receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X₁. *Molecular pharmacology* 62, 957-966.
- Wilkin F., Duhant X., Bruyns C., Suarez-Huerta N., Boeynaems J. M. and Robaye B. (2001) The P2Y₁₁ receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 166, 7172-7177.
- Wilkinson W. J., Jiang L. H., Surprenant A. and North R. A. (2006) Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X_{2/3} receptor. *Molecular pharmacology* 70, 1159-1163.
- Winkler H. C., S.W (1982) The chromaffin granule. In: *The secretory granule. eds. Elsevier Biomedical Press, New York*, 3-78.
- Wirkner K., Sperlagh B. and Illes P. (2007a) P2X₃ receptor involvement in pain states. *Molecular neurobiology* 36, 165-183.
- Wirkner K., Schweigel J., Gerevich Z., Franke H., Allgaier C., Barsoumian E. L., Draheim H. and Illes P. (2004) Adenine nucleotides inhibit recombinant N-type calcium channels via G protein-coupled mechanisms in HEK 293 cells; involvement of the P2Y₁₃ receptor-type. *British journal of pharmacology* 141, 141-151.
- Wirkner K., Gunther A., Weber M., Guzman S. J., Krause T., Fuchs J., Koles L., Norenberg W. and Illes P. (2007b) Modulation of NMDA receptor current in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex by P2Y receptor activation. *Cereb Cortex* 17, 621-631.
- Woodgett J. R. (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *The EMBO journal* 9, 2431-2438.
- Woodgett J. R. (1991) cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3. *Methods in enzymology* 200, 564-577.
- Wu X., Zhu D., Jiang X., Okagaki P., Mearow K., Zhu G., McCall S., Banaudha K., Lipsky R. H. and Marini A. M. (2004) AMPA protects cultured neurons against glutamate excitotoxicity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation in extracellular signal-regulated kinase to upregulate BDNF gene expression. *Journal of neurochemistry* 90, 807-818.
- Wyss-Coray T., Loike J. D., Brionne T. C., Lu E., Anankov R., Yan F., Silverstein S. C. and Husemann J. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nature medicine* 9, 453-457.

- Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. J. and Greenberg M. E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science (New York, N.Y)* 270, 1326-1331.
- Xiang Z. and Burnstock G. (2005a) Changes in expression of P2X purinoceptors in rat cerebellum during postnatal development. *Brain research* 156, 147-157.
- Xiang Z. and Burnstock G. (2005b) Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. *Glia* 52, 119-126.
- Xiang Z., He C. and Burnstock G. (2006a) P2X5 receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1099, 56-63.
- Xiang Z., Lv J., Jiang P., Chen C., Jiang B. and Burnstock G. (2006b) Expression of P2X receptors on immune cells in the rat liver during postnatal development. *Histochemistry and cell biology* 126, 453-463.
- Xifro X., Malagelada C., Minano A. and Rodriguez-Alvarez J. (2005) Brief exposure to NMDA produces long-term protection of cerebellar granule cells from apoptosis. *The European journal of neuroscience* 21, 827-840.
- Xiong K., Peoples R. W., Montgomery J. P., Chiang Y., Stewart R. R., Weight F. F. and Li C. (1999) Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function. *Journal of neurophysiology* 81, 2088-2094.
- Xu G. Y. and Huang L. Y. (2004) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11868-11873.
- Yakovlev A. G. and Faden A. I. (2001) Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Molecular neurobiology* 24, 131-144.
- Yamada M., Tanabe K., Wada K., Shimoke K., Ishikawa Y., Ikeuchi T., Koizumi S. and Hatanaka H. (2001) Differences in survival-promoting effects and intracellular signaling properties of BDNF and IGF-1 in cultured cerebral cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 78, 940-951.
- Yamagishi S., Matsumoto T., Yokomaku D., Hatanaka H., Shimoke K., Yamada M. and Ikeuchi T. (2003) Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 119, 184-191.
- Yamamoto H., Kishida S., Kishida M., Ikeda S., Takada S. and Kikuchi A. (1999) Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 β regulates its stability. *The Journal of biological chemistry* 274, 10681-10684.
- Yamamoto K., Sokabe T., Matsumoto T., Yoshimura K., Shibata M., Ohura N., Fukuda T., Sato T., Sekine K., Kato S., Isshiki M., Fujita T., Kobayashi M., Kawamura K., Masuda H., Kamiya A. and Ando J. (2006) Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature medicine* 12, 133-137.
- Yanagisawa D., Kitamura Y., Takata K., Hide I., Nakata Y. and Taniguchi T. (2008) Possible involvement of P2X7 receptor activation in microglial neuroprotection against focal cerebral ischemia in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31, 1121-1130.
- Yang-Snyder J., Miller J. R., Brown J. D., Lai C. J. and Moon R. T. (1996) A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol* 6, 1302-1306.
- Yang M., Zhong W. W., Srivastava N., Slavin A., Yang J., Hoey T. and An S. (2005) G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the {beta}-catenin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6027-6032.
- Yerxa B. R., Sabater J. R., Davis C. W., Stutts M. J., Lang-Furr M., Picher M., Jones A. C., Cowlen M., Dougherty R., Boyer J., Abraham W. M. and Boucher R. C. (2002) Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)-(2'-deoxycytidine 5')] tetraphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y(2) receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302, 871-880.
- Yokomizo T., Izumi T., Chang K., Takuwa Y. and Shimizu T. (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 387, 620-624.
- Yoshida R., Yasumatsu K., Shigemura N. and Ninomiya Y. (2006) Coding channels for taste perception: information transmission from taste cells to gustatory nerve fibers. *Archives of histology and cytology* 69, 233-242.
- Yoshioka K. and Nakata H. (2004) ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: purinergic receptor complex: generating adenosine nucleotide-sensitive adenosine receptors. *Journal of pharmacological sciences* 94, 88-94.
- Yoshioka K., Saitoh O. and Nakata H. (2002) Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A(1) and P2Y(1) receptors in living cells. *FEBS letters* 523, 147-151.
- Young M. T., Pelegrin P. and Surprenant A. (2006) Identification of Thr283 as a key determinant of P2X7 receptor function. *British journal of pharmacology* 149, 261-268.
- Young M. T., Pelegrin P. and Surprenant A. (2007) Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Molecular pharmacology* 71, 92-100.
- Yu Y. and de Groat W. C. (2008) Sensitization of pelvic afferent nerves in the in vitro rat urinary bladder-

- pelvic nerve preparation by purinergic agonists and cyclophosphamide pretreatment. *American journal of physiology* 294, F1146-1156.
- Zemkova H., He M. L., Koshimizu T. A. and Stojilkovic S. S. (2004) Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors. *J Neurosci* 24, 6968-6978.
- Zemkova H., Yan Z., Liang Z., Jelinkova I., Tomic M. and Stojilkovic S. S. (2007) Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. *Journal of neurochemistry* 102, 1139-1150.
- Zhang F., Phiel C. J., Spece L., Gurvich N. and Klein P. S. (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *The Journal of biological chemistry* 278, 33067-33077.
- Zhang F. L., Luo L., Gustafson E., Lachowicz J., Smith M., Qiao X., Liu Y. H., Chen G., Pramanik B., Laz T. M., Palmer K., Bayne M. and Monsma F. J., Jr. (2001) ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *The Journal of biological chemistry* 276, 8608-8615.
- Zhang F. X., Rubin R. and Rooney T. A. (1998) N-Methyl-D-aspartate inhibits apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cerebellar granule neurons. A role for insulin receptor substrate-1 in the neurotrophic action of n-methyl-D-aspartate and its inhibition by ethanol. *The Journal of biological chemistry* 273, 26596-26602.
- Zhang W., Zhao Y., Tong C., Wang G., Wang B., Jia J. and Jiang J. (2005) Hedgehog-regulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of Cubitus interruptus. *Developmental cell* 8, 267-278.
- Zhou B. P., Deng J., Xia W., Xu J., Li Y. M., Gunduz M. and Hung M. C. (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology* 6, 931-940.
- Zhu D., Lipsky R. H. and Marini A. M. (2002) Co-activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway by N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors in cerebellar granule cell neurons. *Amino acids* 23, 11-17.
- Zhu D., Wu X., Strauss K. I., Lipsky R. H., Qureshi Z., Terhakopian A., Novelli A., Banaudha K. and Marini A. M. (2005) N-methyl-D-aspartate and TrkB receptors protect neurons against glutamate excitotoxicity through an extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of neuroscience research* 80, 104-113.
- Zimmermann H. (1978) Turnover of adenine nucleotides in cholinergic synaptic vesicles of the Torpedo electric organ. *Neuroscience* 3, 827-836.
- Zimmermann H. (1994) Signalling via ATP in the nervous system. *Trends in neurosciences* 17, 420-426.
- Zimmermann H. (1996) Extracellular purine metabolism. *Drug Develop. Res* 39 337-352.
- Zimmermann H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362, 299-309.
- Zimmermann H. and Denston C. R. (1976) Adenosine triphosphate in cholinergic vesicles isolated from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Brain Res* 111, 365-376.
- Zirrgiebel U., Ohga Y., Carter B., Berninger B., Inagaki N., Thoenen H. and Lindholm D. (1995) Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival. *Journal of neurochemistry* 65, 2241-2250.